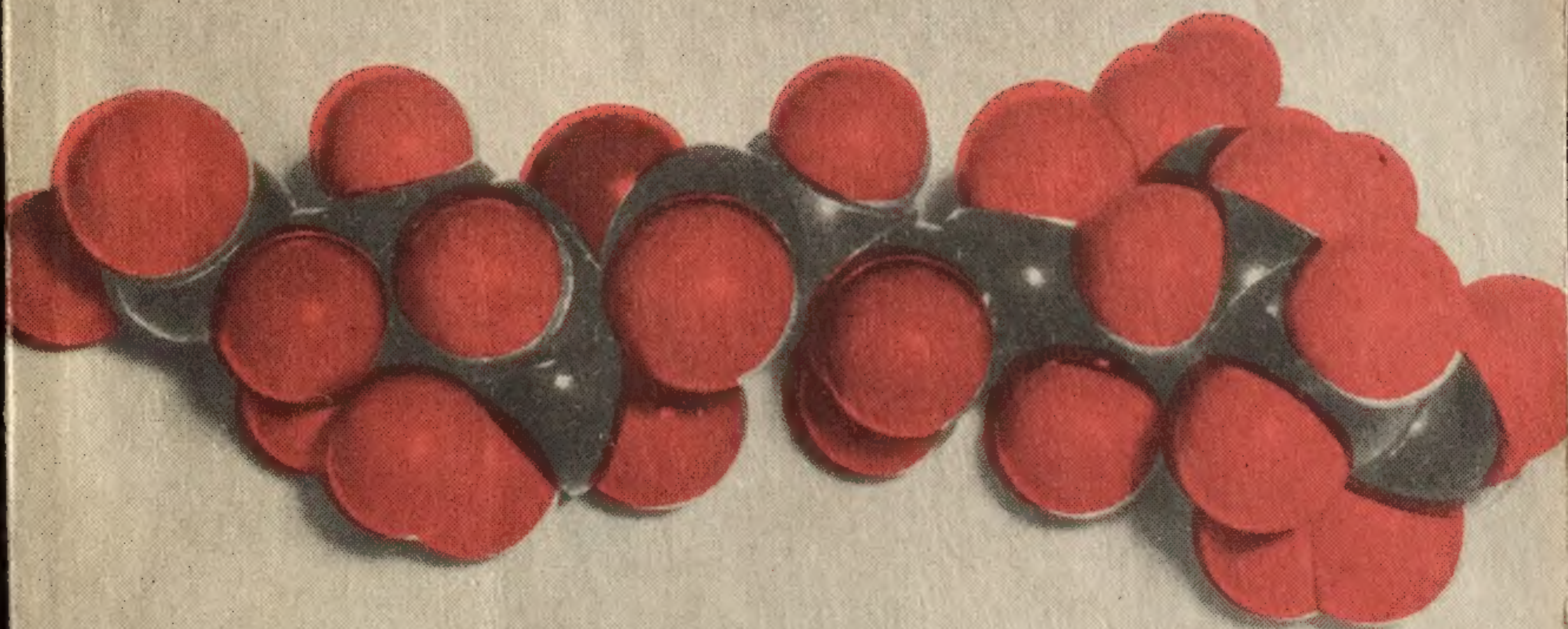


С.А. Дамбинова

Нейро- рецепторы. ГЛУТАМАТА



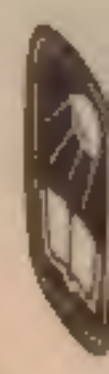
АКАДЕМИЯ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ
НАУЧНЫЙ СОВЕТ
ПО ФИЗИОЛОГИИ

С.

Н

ре

ГЛУТА



АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И. П. ПАВЛОВА

НАУЧНЫЙ СОВЕТ АН СССР И АМН СССР
ПО ФИЗИОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

С. А. Дамбинова

Нейро-
рецепторы
ГЛУТАМАТА



ЛЕНИНГРАД
«НАУКА»

Ленинградское отделение
1989

УДК 612.822.1 : 577.112.083

Дамбинова С. А. Нейрорецепторы глутамата. — Л.: Наука, 1989. — 144 с.

В монографии представлены результаты собственных исследований и современные данные литературы, касающиеся молекулярных, ионофорных и фармакологических характеристик глутаматных рецепторов головного мозга млекопитающих, включая человека. Показано, что нейрорецепторы глутамата представляют собой сложные олигомерные комплексы на мембране, состоящие из рецепторного, модуляторного и ионофорного компонентов. На основе изучения иммунохимических свойств глутаматных рецепторов сделаны предположения о возможной их пространственной организации и топографии на мембране нейрона. В свете возможных нарушений структуры и функции рецепторов глутамата рассмотрены аутоиммунные механизмы патогенеза эпилепсии и некоторых других заболеваний ЦНС. Представлены перспективы направленного поиска антиэпилептических средств, избирательно действующих на глутаматные рецепторы. Обсуждается вклад глутаматных рецепторов в организацию высшей нервной деятельности у высших млекопитающих, включая человека.

Библиогр. 356 назв., ил. 30, табл. 25.

Ответственный редактор

академик АМН СССР А. Н. КЛИМОВ

Рецензенты:

Н. Н. Демин, И. П. Ашмарин

Научное издание

Светлана Александровна Дамбинова
НЕЙРОРЕЦЕПТОРЫ ГЛУТАМАТА

Утверждено к печати Институтом физиологии им. И. П. Павлова Академии наук СССР

Редактор издательства К. Б. Шаповалова. Художник И. П. Кремлев. Технический редактор Н. А. Кругликова. Корректоры И. А. Корзинина и А. Х. Салтанова
ИБ № 33311

Сдано в набор 12.07.88. Подписано в печать 15.02.89. М-34036. Формат 60×90¹/₁₆. Бумага офсетная № 1. Гарнитура литературная. Печать офсетная. Фотонабор. Усл. печ. л. 9. Усл. кр.-от. 9.24. Уч.-изд. л. 10.96. Тираж 1850. Тип. зак. 599. Цена 2 р. 20 к.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Наука». Ленинградское отделение. 199034, Ленинград, В-34, Менделеевская лин., 1.

Ордена Трудового Красного Знамени Первая типография издательства «Наука». 199034, Ленинград, В-34, 9 линия, 12.

Д 2007020000-531
042(02)-89 261-88—IV

© Издательство «Наука», 1989 г.

ISBN 5-02-025758-3

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Введение	5
Глава 1. Глутаматные рецепторы. Физиологическое значение в нервной ткани	8
1.1. Метаболизм глутамата в центральных синапсах	8
1.2. Роль глутамата и глутаматсодержащих пептидов в организации высшей нервной деятельности	13
1.3. Вовлечение глутаматергических систем в механизмы патогенеза эпилепсии	19
1.4. Некоторые аспекты эволюции рецепторов глутамата	28
Глава 2. Распределение и свойства глутаматсвязывающих участков синаптических мембран головного мозга	35
2.1. Глутаматергические пути головного мозга млекопитающих и локализация глутаматных рецепторов в нейронах	35
2.2. Рецепторное связывание L- ³ H-глутамата с мембранами нервных клеток: влияние катионов Na ⁺ и Ca ²⁺	43
2.3. Взаимодействие структурных аналогов глутамата с синаптическими мембранами	52
2.4. Классификация глутаматных рецепторов	63
Глава 3. Физико-химические и иммунохимические характеристики глутаматсвязывающих мембранных белков головного мозга	70
3.1. Глутаматсвязывающая активность выделенных и очищенных препаратов синаптических мембранных белков	70
3.2. Химический состав и кДНК, кодирующая синтез глутаматсвязывающих мембранных белков	81
3.3. Сравнительный анализ физико-химических свойств глутаматсвязывающих мембранных белков мозга крыс и человека	89
3.4. Иммунохимическая идентификация глутаматных рецепторов в головном мозгу).	94
Глава 4. Регуляция ионселективной и транспортной функции глутаматных рецепторов в мембранных везикулах, протеолипосомах и интактных нейронах	104
4.1. Применение липосом и мембранных везикул для изучения функции рецепторных белков	104
4.2. Изучение особенностей функционирования глутаматных рецепторов в гибридных клетках нейробластомы	110
4.3. Исследование механизмов активации и блокирования ионных каналов, управляемых L-глутаматом	114
4.4. Регуляция функции глутаматных рецепторов головного мозга	118
Заключение	125
Литература	129

ПРЕДИСЛОВИЕ

Физиолого-биохимические сопоставления, проводимые в рамках комплексного подхода к изучению принципов и механизмов структурно-функциональной организации систем обеспечения сложных видов деятельности головного мозга человека применяются в Отделе нейрофизиологии человека НИИ экспериментальной медицины более 20 лет. Новый — молекулярный — аспект этих исследований получил развитие лишь в последние годы благодаря появившейся возможности анализа тонких химических процессов, которые имеют отношение к механизмам повышения эффективности синаптической передачи. Интерес к этой проблеме обусловлен актуальностью поиска «биохимической расшифровки» тех физиологических коррелятов, которые лежат в основе мозговых кодов различных форм деятельности у человека, в том числе психической. Поэтому существенно важно было определить те конкретные биохимические реакции, которые способны участвовать в обеспечении высокой скорости передачи информации в головном мозгу, с одной стороны, и с другой — поддерживать высокий уровень энергетического метаболизма в нервной ткани.

В последние годы становится очевидным, что одним из наиболее важных энергетических метаболитов ткани головного мозга являются кислые дикарбоновые аминокислоты — L-глутамат и L-аспартат, которые обладают выраженным возбуждающим действием на нейроны. Общеизвестно, что они являются основными возбуждающими нейротрансмиттерами в головном мозгу млекопитающих. Вместе с тем нейрорецепторы возбуждающих аминокислот мало изучены. Монография С. А. Дамбиновой восполняет существующий пока пробел в отечественной литературе, посвященной этому классу нейрорецепторов. Содержанием монографии наряду с привлеченными автором обширными современными сведениями литературы в основном послужили материалы собственных экспериментальных исследований С. А. Дамбиновой и ее сотрудников. В своей монографии автор осветил и такие общие вопросы современной нейробиологии, как молекулярные основы взаимного «узнавания» нейронов, роль нейропептидов в высших функциях мозга, механизмы регуляции эффективности синаптической передачи. Критическое, творческое обобщение собственных экспери-

ментальных и литературных данных позволяет, в частности, по-иному взглянуть на известные патогенетические механизмы ряда неврологических нарушений, особенно при эпилепсии. Эти материалы дают возможность повысить эффективность поиска новых лекарственных средств для лечения эпилепсии.

Особое внимание в монографии уделяется свойствам глутаматных рецепторов, изолированных из ткани головного мозга человека. Иммуноцитохимический анализ распределения этих рецепторных белков в нейронах позволяет решить проблему визуализации глутаматных рецепторов в нервной ткани в норме и при патологических процессах. Обсуждение возможности применения моноклональных антител для маркирования глутаматрецептивных путей в головном мозгу у человека при использовании в клинике метода позитронно-эмиссионной томографии имеет под собой почву. Этот метод получает в последние годы все более широкое распространение для изучения метаболизма ряда нейрорецепторов головного мозга *in vivo* у человека в процессе выполнения различных видов деятельности и поведенческих реакций. Научные перспективы исследования вклада глутаматных рецепторов в механизмы развития сложных психических функций у человека представляются многообещающими. Хотелось бы надеяться, что содержащиеся в этой книге материалы окажутся интересными тем, кто работает в этой увлекательной области.

Июнь 1987 г.

Академик Н. П. Бехтерева

В В Е

Разра

века требует п
в нервной ткани
функций мозга
ных исследовани
тельности здоров
руководством ак
ровать дальнейш
химии — поиск
коррелят мозгов
в частности моле
ческих сигналов
ментов.

В настоящее в
и превращений ме
Однако при детал
что большинство
скоростной переда
мостью углубленн
нейрональной мем
турных компонент
комплексов на мем
мания интегративн
цессов их взаимодей
сложной деятельности
Значительный ин
ние годы обусловле
ностью вызывать во
и

ВВЕДЕНИЕ

Разработка проблем современной биохимии мозга человека требует понимания базисных метаболических процессов в нервной ткани, которые лежат в основе формирования высших функций мозга (памяти, эмоций, мышления). Результаты успешных исследований нейрофизиологических принципов жизнедеятельности здорового и больного мозга человека, проводимых под руководством академика Н. П. Бехтеревой, позволяют сформулировать дальнейшие перспективные задачи функциональной нейробиологии — поиск биохимической расшифровки физиологических коррелятов мозговых кодов психической деятельности человека, в частности молекулярных аспектов приема и переработки химических сигналов в синаптическом аппарате нейрональных элементов.

В настоящее время многие особенности метаболизма нейронов и превращений медиаторов в синапсах изучены достаточно полно. Однако при детальном анализе функций нейронов оказывается, что большинство неизученных вопросов, касающихся механизмов скоростной передачи химических сигналов, связаны с необходимостью углубленного исследования молекулярной организации нейрональной мембраны, природы и свойств ее важных структурных компонентов — нейрорецепторов. Изучение рецепторных комплексов на мембране нейрона является ключевым для понимания интегративных функций этих клеток, молекулярных процессов их взаимодействия между собой, которые лежат в основе сложной деятельности мозга человека.

Значительный интерес к медиаторной роли глутамата в последние годы обусловлен прежде всего его ярко выраженной способностью вызывать возбуждающий эффект в большинстве нейронов млекопитающих и нервно-мышечных синапсах беспозвоночных. Кроме того, глутаматсвязывающие участки обнаружены на мембранах самых разных животных: от низших до приматов. Эти факты ставят проблему изучения функциональной организации глутаматных рецепторов в круг вопросов, ответы на которые могут дополнить представление о ходе эволюции химических факторов переноса информации в разнообразных биологических системах. С другой стороны, понимание механизмов структурной организа-

ции глутаматных рецепторов позволяет получить представление об эволюции разных типов нейрорецепторов, а именно рецепторов медиаторных кислот и пептидов, их взаимосвязи и иерархии в системе обеспечения интегративных функций головного мозга человека.

Широкая распространенность глутаматергических и глутаматрецептивных синапсов в разных структурах головного мозга, ответственных за проявление высших психических и двигательных функций, наличие в нервной ткани огромного спектра глутаматсодержащих пептидов дают основание полагать, что рецепторы глутамата участвуют в реализации сложных поведенческих реакций, развитии эмоциональных и мыслительных процессов. Кроме того, тот факт, что глутаматные рецепторы являются важными структурными компонентами нервных путей, проводящих возбуждение в головном мозгу, свидетельствует о преимущественном вовлечении этого типа нейрорецепторов в процессы гиперактивности нейронов, наблюдающихся при эпилепсии.

Глутаматные рецепторы ЦНС у высших млекопитающих изучены значительно меньше, чем у беспозвоночных. Практически не изучены они в ткани мозга у человека. Эта диспропорция особенно наглядна при сравнении с исследованиями других нейромедиаторов головного мозга, таких как ацетилхолин и катехоламины.

Причины этого положения следует искать в том, что трудности изучения глутаматных рецепторов связаны прежде всего с отсутствием специфических блокаторов, способных необратимо связываться с рецепторами и служить в качестве метки. Подобные соединения, например α -бунгаротоксин, используемые для изучения никотиновых холинорецепторов, как показывают результаты исследований, нередко определяют успех в изучении природы и свойств любых рецепторных белков.

Кроме того, анализ молекулярных свойств глутаматных рецепторов существенно осложняется высокой метаболической активностью глутамата в клетке, наличием большого числа глутаматутилизирующих ферментов, в том числе и синаптических (например, глутаматдекарбоксилаза, глутаминаза и многие другие). Трудности изучения рецепторов глутамата также вызваны существованием процессов поглощения и транспорта этой аминокислоты в синапсе. Поэтому основным критерием изучения глутаматных рецепторов является наличие у них специфических функций.

Основной функцией глутаматного рецептора является регуляция ионной проницаемости нейрональных мембран и генерирование постсинаптического потенциала. Возникающий при этом локальный электрический ток способен запустить общие механизмы электрогенеза клетки. Процесс генерирования глутаматвозбудимого потенциала является многоступенчатым и состоит из нескольких элементарных актов: узнавание и связывание глутамата, перестройка структуры рецептора, способствующая

открыванию ионного канала и избирательному транспорту ионов в клетку.

Для глутаматного рецептора особенности этих молекулярных процессов изучены крайне недостаточно. В большей степени это касается молекулярной природы и функциональной организации рецептора. До сих пор неясно, как выполняются регулирующие функции рецептора, связаны ли они с единым комплексом на мембране или сопряжены с разными мембранными структурами. Не выяснена структура активного центра рецепторной молекулы, не исследованы механизмы, лежащие в основе его активирования, практически нет данных о топографии и пространственной организации рецептора на мембране нейрона. И, наконец, возникают вопросы о возможных последствиях нарушения структуры и функции рецепторов глутамата, о сопоставлении указанных поражений глутаматрецептивных синапсов с определенной симптоматикой некоторых нервных заболеваний, например эпилепсии.

Рассмотрению этих вопросов посвящена настоящая монография. В книге обобщены современные данные и результаты собственных исследований, касающихся преимущественно биохимического исследования глутаматных рецепторов и их структурно-функциональной характеристики. Эта работа представляет собой некоторый итог исследований коллектива биохимиков, химиков, физиологов и иммунологов Отдела нейрофизиологии человека (руководитель академик Н. П. Бехтерева), Отдела фармакологии (руководитель профессор Ю. С. Бородкин) НИИ экспериментальной медицины АМН СССР. Оригинальные экспериментальные данные, изложенные в этой книге, принадлежат А. И. Городинскому, В. И. Беседину, М. Н. Маргулису, О. Н. Корешонкову, М. Н. Деминой, Е. А. Орловой, Т. М. Смирновой, Н. И. Кудряшовой, Л. Б. Пиотровскому, Д. В. Иоффе, М. Н. Думпис и др. Приношу всем коллегам искреннюю благодарность. Считаю своим приятным долгом выразить признательность за помощь в подготовке рукописи к печати Г. А. Изыкеновой и А. А. Логиновой. Все замечания, советы и рекомендации по изданию книги будут приняты автором с благодарностью.

Глава I

ГЛУТАМАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ. ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ В НЕРВНОЙ ТКАНИ

1.1. Метаболизм глутамата в центральных синапсах

Одной из наиболее распространенных аминокислот, имеющих функционально важное значение для организма, является глутаминовая кислота. Эта дикарбоновая кислота участвует в огромном разнообразии метаболических превращений практически во всех клетках (Кричевская и др., 1983). Метаболизм глутамата (аниона глутаминовой кислоты) играет центральную роль в тканях головного мозга (Shank et al., 1979). На долю глутамата и структурно родственных ему аминокислот (аспартата), ГАМК, таурина и др.) приходится около 70 % от общего фонда свободных аминокислот в нервной ткани (Захарова, Осадчая, 1978). Ключевыми процессами в тканях мозга, в которых глутамат принимает непосредственное участие, являются не только синаптическая передача, но и энергетический метаболизм (Годухин и др., 1983).

Необходимо отметить, что фактически пристальное внимание исследователей к глутамату проявилось после работ, в результате которых убедительно была обоснована его медиаторная функция в ЦНС (De Feudis, 1975; Hamberger et al., 1979a, b; Meister, 1979).

Впервые предположение о медиаторной роли L-глутамата было выдвинуто Хаяши (Hayashi, 1956) и позднее Кертисом (Curtis, Watkins, 1959, 1960) и Криевичем (Krnjević, Philips, 1963). Однако функция кислых аминокислот в качестве возбуждающих нейромедиаторов мозга длительное время подвергалась сомнению из-за ряда причин (Curtis, 1979).

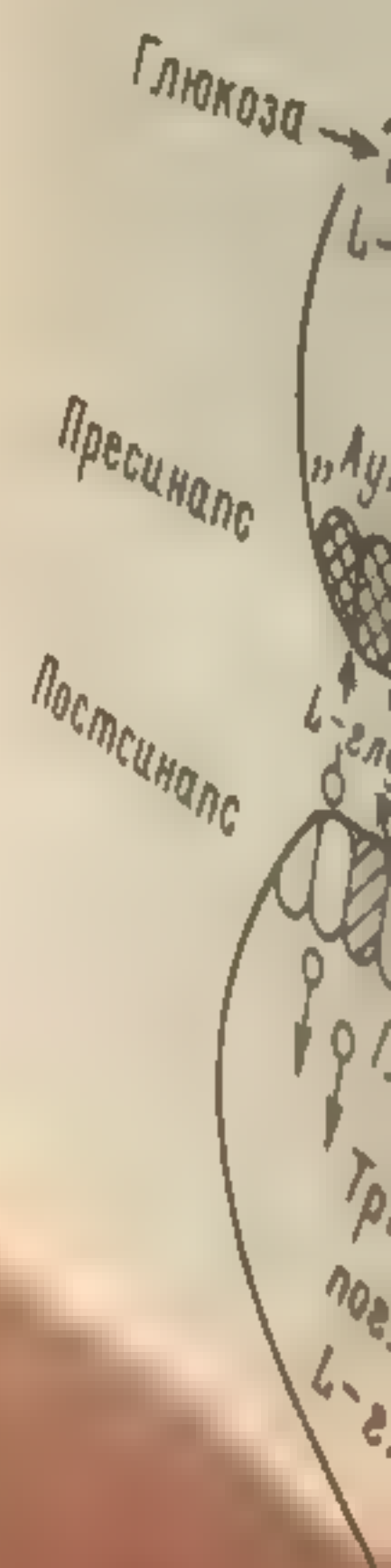
Согласно критериям отбора кандидатов в нейромедиаторы, последние должны обладать рядом характерных свойств, из которых наиболее важными являются: проявление биологической активности в очень малых концентрациях, избирательная локализация и секреция их в синапсах в количестве, соответствующем числу подаваемых электрических стимулов, ферментативное устранение из синапса и наличие специфических рецепторов, воспринимающих химический сигнал и регулирующих физиологическую функцию (Глебов, Крыжановский, 1978; Оггегго, 1979).

Глутамат удовлетворяет большинству указанных требований. Однако основной причиной, по которой медиаторная функция

глутамата н
стве данн
в синапсе. В
нение глутам
его происхо
пресинаптич
поглощения
Curtis, Johns
Вопрос о
количество и
мата в нейро
напсах.

Несмотря
уточнений,
происходящи
и соавт. (Ме
образом (рис

В отличие
ных) глутам
нервными кле
метаболическ
в головной мо
порта других
(Hamberger et
В настоящее
мата пополняе



глутамата нуждалась в строгих доказательствах, являлось отсутствие данных о ферментативной деградации этой аминокислоты в синапсе. Впоследствии стало ясно, что ферментативное устранение глутамата не имеет существенного значения и инактивация его происходит за счет высокоспецифичного обратного захвата пресинаптическими нервными окончаниями и преимущественного поглощения медиатора глиальными клетками (De Feudis, 1975; Curtis, Johnston, 1981).

Вопрос о медиаторной роли глутамата стимулировал большое количество исследований, посвященных путям биосинтеза глутамата в нейронах и глиоцитах, способам инактивации его в синапсах.

Несмотря на то что многие детали этих процессов еще требуют уточнений, основные сопрягающие биохимические реакции, происходящие в глутаматергическом синапсе, согласно Мейстеру и соавт. (Meister et al., 1979), можно представить следующим образом (рис. 1).

В отличие от большинства аминокислот (нейтральных и основных) глутаминовая кислота может активно синтезироваться нервными клетками с высокой скоростью, соизмеримой с их метаболической потребностью. Скорость поступления глутамата в головной мозг у позвоночных много ниже, чем скорость транспорта других аминокислот и низкомолекулярных метаболитов. (Hamberger et al., 1979a).

В настоящее время принято считать, что основной пул глутамата пополняется за счет обмена глюкозы и глутамина, который

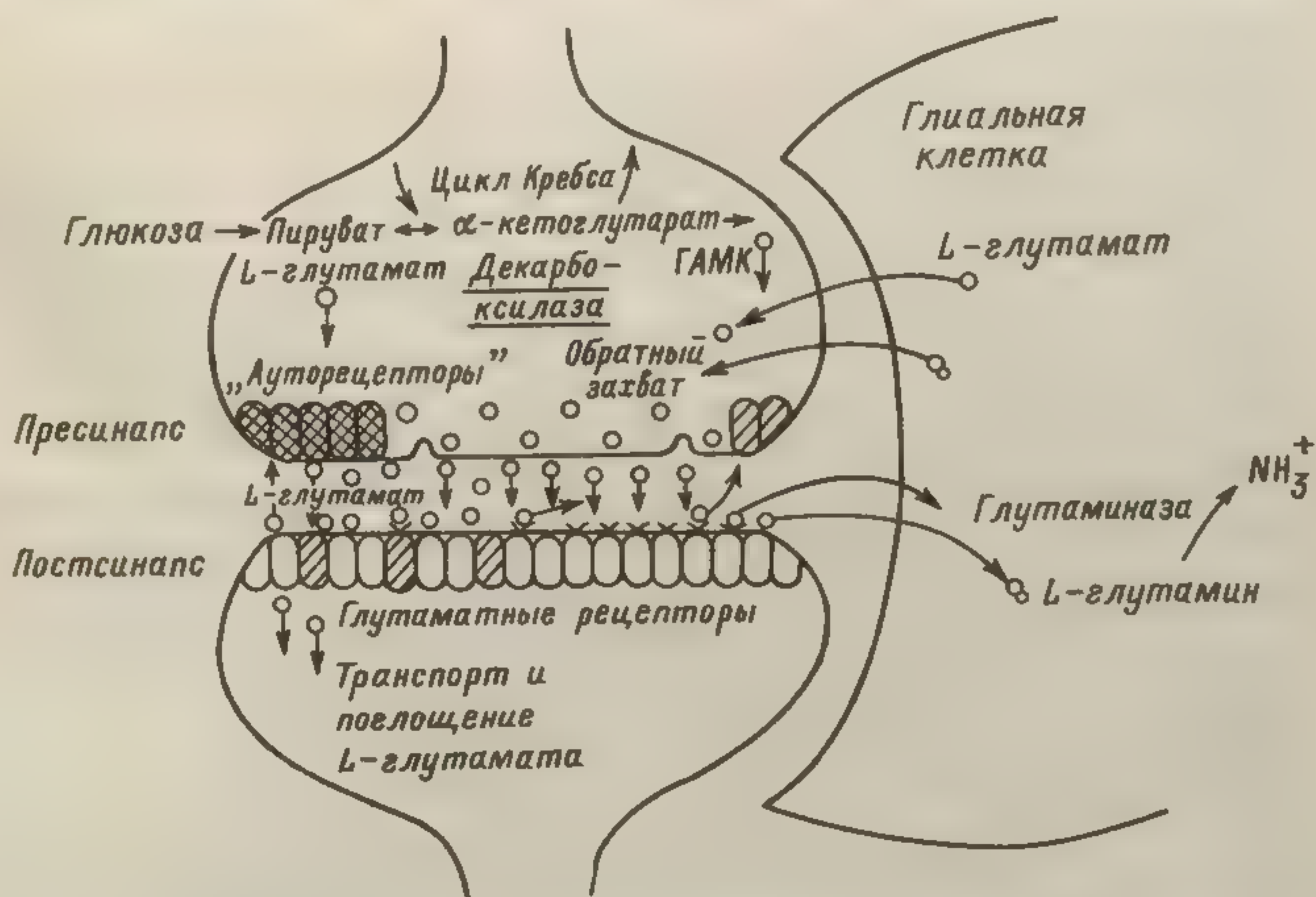


Рис. 1. Биохимические реакции, происходящие в глутаматергическом синапсе (по: Meister et al., 1979).



Рис. 2. Метаболизм L-глутамата в клетках головного мозга (по: Meister et al., 1979).

1 — реакции цикла Кребса; 2 — глутаматдегидрогеназа; 3 — глутаматтрансаминаза; 4 — глутаматсинтетаза; 5 — глутаминаза; 6 — глутаминтрансаминаза; 7 — карбомилфосфат синтеза в печени; 8 — α-кетокислот-α-амидаза; 9 — глутамилцистеинсинтетаза; 10 — глутатионсинтетаза; 11 — γ-глутамилтранспептидаза; 12 — γ-глутамилциклотрансфераза; 13 — 5-оксoproминаза; 14 — цистеинилглициназа; 15 — глутаматдекарбоксилаза.

происходит в цитоплазме и митохондриях нейронов, а также глиальных клеток. Глутамат является важным субстратом энергетического обмена в клетках мозга, т. к. путь окисления глюкозы проходит преимущественно через α-кетоглутарат и глутамат. Скорость образования глутамата путем переаминирования сравнительно мала в нейронах, однако этот путь наиболее энергетически выгоден в глиальных клетках. Как было обнаружено, каждая молекула глутамин может быть источником аминокислот для реакции переаминирования α-кетоглутарата, важного метаболита цикла трикарбоновых кислот (Fonnum, 1984).

Глутамат является ключевым субстратом для многих реакций, происходящих сопряженно с циклом лимонной кислоты (рис. 2; цит. по: Meister et al., 1979). В клетке имеется огромное разнообразие ферментных систем (глутаматдегидрогеназа, глутаматтрансаминаза, глутаматсинтетаза, глутаминаза, глутаматдекарбоксилаза и др.), способствующих его накоплению и утилизации. Особое внимание следует обратить на ферментные системы (глутамилцистеинсинтетаза, глутатионсинтетаза, γ-глутамилтранспептидаза, γ-глутамилциклотрансфераза, цистеинилглициназа), которые позволяют включить L-глутамат в процессы синтеза и деградации низкомолекулярных глутаматсодержащих пептидов в головном мозгу. В последние годы этим пептидам отводится роль

медиаторов и модуляторов синаптических процессов, многие из которых являются специфичными для ткани головного мозга (Кричевская и др., 1983).

Важным моментом в метаболизме глутамата в ЦНС является то, что глутамат, кроме медиаторной функции и субстрата цикла Кребса, выполняет роль предшественника другого, но уже тормозного медиатора — γ -аминомасляной кислоты (ГАМК) (Глебов, Крыжановский, 1978). Количество последней зависит от активности глутаматдекарбоксилазы — фермента, превращающего глутамат в ГАМК путем отщепления карбоксильной группы.

В отличие от ГАМК, распределение которой по структурам мозга имеет свои особенности и связано с ферментами метаболизма аминокислоты, глутамат обнаруживается в нервной ткани в более высокой по сравнению с известными передатчиками концентрации. Например, концентрация L-глутамата в ткани мозга колеблется в пределах 8—12 мкмоль/г, в то время как для ГАМК, аспартата и таурина она составляет соответственно 2, 1.5—3 и 1.5—5 мкмоль/г сырой ткани (Раевский, Георгиев, 1986).

Следует отметить также взаимосвязь метаболизма L-глутамата с другим тормозным медиатором — таурином (Гуревич, 1986). Высвобождение глутаминовой кислоты регулируется таурином, который может восстанавливать содержание глутамата до нормы в мозговой ткани при хроническом возбуждении. С другой стороны, появились сведения о том, что L-глутаминовая кислота участвует в активации рецепторного аппарата тромбоцитов, которые аккумулируют таурин (Mangano et al., 1981; Попов, Городинский, 1987).

Высвобождение кислых аминокислот, так же как и тормозных медиаторов ГАМК и таурина, существенно зависит от присутствия ионов Ca^{2+} . В бескальциевой среде эти процессы ингибировались на 70—80 %, причем такие эффекты наблюдались не только у нейронов, но и в клетках глии (Fagg, Foster, 1983).

Возбуждение в нейронах тесно связано с Ca^{2+} -зависимым выбросом глутамата из пресинаптических везикул, после чего они взаимодействуют с постсинаптическими рецепторами и должны мгновенно инактивироваться. Механизмы инактивации состоят преимущественно из двух процессов: транспорта назад в нервную терминаль и скоростной диффузии с последующим поглощением в глиальные клетки. Глутамат легко утилизируется в глутамин, который выделяется в экстраклеточное пространство и не обладает возбуждающим действием на глутаматные рецепторы. Этот глутамин способен затем поступить в нейрон, чтобы пополнить запасы нейромедиатора (Snyder, 1983).

Указанные транспортные и инактивирующие системы играют важную роль в поддержании и сохранении экстраклеточной концентрации глутамата существенно ниже уровня, необходимого для нейронального возбуждения. По самым последним данным, этот уровень не должен превышать концентрацию глутамата 20—60 мкМ, в то время как для возбуждающего действия нейро-

медиатора его концентрация в синапсе должна возрасти до 120—150 мкМ (De Feudis, Mandel, 1981).

В настоящее время получены убедительные доказательства медиаторной функции глутамата в головном мозгу млекопитающих. Кажущаяся неспецифичность действия глутамата была объяснена широким распространением глутаматергических и глутаматрецептивных связей в разных структурах мозга. Важнейшим доказательством явилось обнаружение специфических структур на мембране нейрона — глутаматных рецепторов.

Первыми исследователями, предположившими существование глутаматных рецепторов, управляющих электрической возбудимостью соответствующих мембран нейрона, были Кертис и Уоткинс (Curtis, Watkins, 1960), которые показали, что аппликация глутамата только на поверхность определенных нейронов вызывала деполяризацию или гиперполяризацию клетки. Введение глутамата внутрь нейрона не изменяло мембранный потенциал клетки. Результаты последующих электрофизиологических исследований подтвердили реальность существования глутаматных рецепторов. Они были обнаружены в самых разнообразных системах: от нервно-мышечных синапсов беспозвоночных до нервных связей в структурах головного и спинного мозга млекопитающих, а также в зрительных, обонятельных и вкусовых рецепторах у многих представителей животного мира.

Предположение об ионных механизмах, лежащих в основе возбуждающего действия глутамата, были также выдвинуты Кертисом с сотр. (Curtis et al., 1961), а затем Брэдфордом и МакИльвейном (Bradford, McIlwain, 1966). Однако только в последнее десятилетие появились убедительные доказательства ионофорной функции глутаматных рецепторов (Fagg, 1985). И хотя некоторые общие принципы ионной проницаемости мембран, преимущественно на отдельных изолированных нейронах (Hösli, Hösli, 1976; Watkins, Evans, 1981), чувствительных к глутамату, уже изучены, однако все еще остаются неизвестными многие механизмы синаптических процессов в головном мозгу, управляемых глутаматом.

Эти проблемы связаны со структурными особенностями нейронов у высших млекопитающих — наличием у них соматической и дендритной локализации глутаматных рецепторов. Полирецепторность нейронов к разным нейромедиаторам, бифазные эффекты L-глутамата на некоторые из них, присутствие в синапсах структурно родственных глутамату аминокислот (аспартата, гомоцистеина), обладающих одинаковым действием на клетку, значительно осложняет проведение электрофизиологических исследований элементарных синаптических реакций в межнейрональных контактах (Шаповалов, Ширяев, 1987).

Разработка новых биохимических и иммунохимических методов изучения сложных компонентов мембран нейронов — наиболее трудной области белковой химии — позволила многим исследователям перейти от интенсивного исследования нейромедиаторного

метаболизма в ткани головного мозга к активному изучению проблем хеморецепции ■ иммунореактивности нейронов ■ разных функциональных состояниях.

1.2. Роль глутамата и глутаматсодержащих пептидов ■ организации высшей нервной деятельности

Мозг человека представляет собой уникальный высоко-развитый орган, созданный эволюцией, выполняющий сложные интегративные функции. Наиболее поразительным свойством мозга человека является его способность воспринимать события внешнего мира и реализовывать их ■ виде определенных типов поведения и психической деятельности — сознания, мышления, эмоций и памяти.

Вполне понятно, что изучение базисных механизмов проявления высших психических функций у человека и корреляции их с тонкими нейрохимическими процессами, происходящими в ткани головного мозга, сопряжено с большими трудностями. Особенно это касается молекулярных аспектов проблемы.

Вместе с тем ясно, что стремительное развитие исследований ■ области биохимии нервной системы и успешное накопление фактов, касающихся нейрохимических коррелятов сложных поведенческих процессов у животных и человека, дают основание для оптимизма в решении этих трудных вопросов (Бехтерева, 1980).

В последние годы убедительно показано, что сравнительно простые химические соединения способны участвовать в сложных проявлениях высших функций мозга млекопитающих. Возникло даже направление, которое некоторые исследователи определяют как молекулярную психобиологию (Gaito, 1969). Необходимость более глубокого анализа некоторых нейрофизиологических механизмов деятельности головного мозга млекопитающих побудила многих исследователей обратиться к биохимическим представлениям, касающимся функционирования нейронов на уровне молекулярных событий.

Известно, что большинство биологических явлений в нейронах связано с процессами возбуждения—торможения, в которых принимают участие глутамат и структурно родственные ему аминокислоты — аспартат, ГАМК, таурин и др. Исследования, положившие начало изучению системных эффектов этих аминокислот, появились более 40 лет назад. Так, Маден и др. (Madden et al., 1945) обнаружили, что внутривенное введение смеси аминокислот, ■ особенно L-глутамата и L-аспартата, вызывают токсическую рвотную реакцию с появлением некоторых нарушений вегетативных функций ЦНС. Этот классический подход к анализу поведенческих реакций ■ присутствии избытка нейромедиатора, давший положительные результаты в нейро- и психофизиологии, можно отнести к способам «стимуляции эффекта». В этом случае исследователи значительно увеличивали активность глутаматергических

систем либо в целом организме, либо локально в каких-либо нейрональных элементах и сопоставляли их с организацией поведенческих процессов. Позднее для этой цели стали использовать фармакологические средства, например метаболические блокаторы, усиливающие высвобождение нейромедиатора или накопление аминокислоты в нейронах, а также электростимуляцию определенных структур мозга.

Оказалось, что избыточные дозы глутамата вызывали в большинстве случаев судорожные реакции у крыс, кошек, приматов и даже человека с нарушением у них вегетативных функций и изменением реакции на определенные стимулы (Streit, 1980). Избыточное содержание глутамата в биологических жидкостях у человека коррелировало по ряду симптомов с нарушением психической деятельности. Печально известный «синдром китайского ресторана», обусловленный, как полагают, приемом пищи, содержащей высокие дозы глутамата натрия, характеризовался неприятными ощущениями жжения лица, шеи и тела, снижением мыслительной деятельности и контроля за поведенческими реакциями, что сопровождалось нередко галлюциногенными эффектами (Stegink et al., 1979).

Структурами мозга, наиболее подверженными влиянию избыточных доз глутамата, оказались гипоталамус, гиппокамп и миндалина (Stegink, Reynolds, 1979). Поэтому неудивительно, что воздействия экзогенного L-глутамата вызывали сложные нейроэндокринные изменения у подопытных грызунов и приматов, такие, как тучность, замедление роста и прекращение репродуктивности у животных, которые сопровождалось снижением эмоционального фона и способности к обучению (Heywood, Worden, 1979).

Пластичность глутаматрецептивных систем в центральных нейронах при разных функциональных состояниях организма описали Кияткин, Кольдиц (1986). Они показали, что подведение к корковым нейронам глутамата, ГАМК, ацетилхолина сопровождалось изменением реакции у ненаркотизированных животных на световые, звуковые и болевые стимулы, а также модификацией паттерна импульсов нейронов в условиях пищедобывательного поведения кошек и кроликов.

В нейрофизиологической практике для оценки хемореактивных свойств нейронов при низкой частоте их разрядной деятельности часто используется активация рецепторов глутаматом, которая способна существенно изменять характер ответов клеток на разные подводимые нейромедиаторы и нейропептиды. Например, на фоне подведения L-глутамата в головном мозгу животных резко увеличивается число клеток, чувствительных к цАМФ, норадреналину, серотонину, к ряду пептидных и стероидных гормонов (Кругликов, 1981).

Данные о возможности модификации рецепторов глутамата в нейронах получены также при электрической стимуляции различных центральных структур, приводящей к изменениям поведе-

ния, вегетативных и гормональных показателей (Судаков, 1981, 1983). При этом в нейронах коры больших полушарий были обнаружены изменения чувствительности клеток к ацетилхолину в 78 %, к дофамину в 77 %, а к глутамату в 76 % случаев. В то же время в нейронах гиппокампа это распределение существенно отличалось: модификация чувствительности к ацетилхолину наблюдалась в 62 %, к дофамину в 90 % и к L-глутамату в 94 % случаев (Кияткин, Кольдиц, 1986). Рассмотренные данные расценивались авторами с позиций системных представлений, как нейрохимические корреляты формирования в ЦНС новых интегративных взаимоотношений, направленных на достижение приспособительного для организма результата. Исследователи полагают, что в условиях стресса, при воздействии факторов, нарушающих физиологический, биохимический и психологический (эмоциональный) гомеостаз, происходит изменение функциональных свойств нейронов и их взаимосвязей на уровне постсинаптических структур и их нейрорецепторов (свойств, аффинитета, количества и соотношения рецепторов разных типов) (Коштоянц и др., 1982).

В пользу такой точки зрения можно рассматривать гипотезу, последовательно разрабатываемую Бодри и Линчем (Lynch, Baudry, 1984) и касающуюся вклада глутаматных рецепторов в краткосрочные и долгосрочные механизмы памяти. Они представили вполне убедительную схему ключевых биохимических событий, происходящих в глутаматрецептивных синапсах коры больших полушарий и гиппокампа, ответственных за изменение синаптической эффективности нейронов при длительной посттетанической стимуляции (Baudry et al., 1980a). В пользу этой гипотезы были приведены экспериментальные доказательства, которые получены путем стимуляции тонких срезов гиппокампа («минислоев») множественными электродами таким образом, чтобы большое число смежных групп аксонов давали типичные постсинаптические ответы. Авторам удалось измерить рецепторное связывание L-³H-глутамата с мембранами, выделенными из минислоя, и сопоставить эти данные не только с точными физиологическими эффектами щадящих электростимуляций, но и электронно-микроскопическим анализом срезов. Оказалось, что в указанных экспериментах резко возрастает Ca²⁺-зависимое связывание радиоактивного глутамата, коррелировавшее с индукцией процессов длительной посттетанической потенциации, значительным увеличением в минислоях дендритных ответвлений и повышением числа синаптических контактов (Baudry, Lynch, 1980b). Авторы пришли к заключению, что постсинаптический рисунок нейрональных взаимосвязей в коре и гиппокампе является крайне пластичным и способен регулироваться физиологической активностью клеток. Более того, они показали, что резкое повышение синаптической передачи в этом случае обусловлено активацией «дополнительных» или «новых» глутаматных рецепторов без изменения сродства нейромедиатора к рецептору.

В настоящее время в литературе широко обсуждаются модуляторные и медиаторные свойства нейропептидов, способных существенно видоизменять хеморецептивные функции клеток мозга, лежащие в основе разнообразных поведенческих процессов (Клуша, 1984). В связи с открытием класса регуляторных пептидов заметно изменились общие представления об основных принципах организации и функционирования ЦНС, физиологических механизмах, обеспечивающих жизнедеятельность организма как единого целого. Стало очевидным, что противопоставление гормонов и медиаторов, проводимое ранее некоторыми исследователями, не соответствует действительности. Нейропептиды заполнили «брешь», существовавшую между этими двумя группами соединений, значительно пополнив число межклеточных коннекторов, известных в настоящее время (Вартанян и др., 1984).

Новым в современном изучении пептидов является определение их роли в системной организации оборонительного, мотивационного и эмоционального поведения (Судаков, 1984). Согласно этим воззрениям на механизмы физиологических функций пептидов предполагается, что нейропептиды синтезируются и расщепляются в организме непрерывно, причем динамика их регулируется изменяющимися условиями окружающей среды (Ашмарин, 1984). В этом случае длина пептидной цепи благодаря деградации расщепляющими ферментами находится в постоянном изменении, образуя короткие пептиды, которые и позволяют организму быстро и гибко адаптироваться в окружающей обстановке путем модулирования поведенческих реакций (Ашмарин, 1985, 1986, 1987).

Принципиально важным в этом плане является выяснение функции многочисленных малых пептидов головного мозга, содержащих в своем составе глутамат и обладающих выраженным центральным действием на нервную систему. Для некоторых из них уже определены спектры их функционального действия в головном мозгу млекопитающих (Köller, Coyle, 1985).

В последние годы благодаря усовершенствованию методов биохимического эксперимента из мозга выделена большая группа ди- и трипептидов, основными компонентами которых являются специфические для ЦНС N-ацетиласпартат, глутамат и ГАМК.

N-ацетил- α -L-аспартил-L-глутаминовый пептид (N-ААГ) впервые был обнаружен в ткани мозга человека и кролика (Кричевская и др., 1983). Показано, что он специфичен для мозга млекопитающих и птиц и количество его в мозгу резко возрастает в течение постнатального развития. Это может свидетельствовать о специфической роли N-ААГ в формировании физиологической активности мозга. При анализе функции этого пептида было обнаружено, что он действует аналогично ГАМК, вероятно, посредством оказания гиперполяризующего эффекта на нейроны, вызывая торможение во всех исследуемых участках (лобно-теменной доли коры больших полушарий, передней доли мозжечка, центральном ядре таламуса, периаквадуктном сером веществе промежуточного мозга). Интересно, что, например, в определенных участках коры

больших полушарий нейроны реагировали на N-ААГ возбуждением (более чем 50 % обследованных клеток). Выдвигается предположение, что пептиды, содержащие N-ААГ, могут быть тканевыми гормонами, ответственными за секрецию или торможение секреции гипофизарных гормонов, включая АКТГ.

Наиболее обширную группу пептидов мозга составляют низкомолекулярные γ -глутамилсодержащие пептиды (Tal et al., 1982). Так, из мозга быка выделили: γ -L-глу-L-глу, γ -L-глу-L-глю, γ -L-глу-L-гли, γ -L-глу-L-ала, γ -L-глу-L-вал, S-метил-глутатион, γ -L-глу-L-гис ■ γ -L-глутамил- α -аминобутирил-L-глицин (офтальмовую кислоту). Из мозга обезьян было выделено восемь γ -глутамилпептидов, в том числе γ -глу-L-изолей и γ -глу-L-ала-L-глу. К глутамилпептидам относится ■ широко распространенный во всех тканях, в том числе ■ в ткани головного мозга, трипептид глутатион — γ -глу-цис-гли. Практически все глутамилпептиды специфичны для мозга, за исключением глутатиона и офтальмовой кислоты (Ogita et al., 1986). Концентрация глутамилпептидов в мозгу чрезвычайно низка, ■ пределах 0.1—10 мкг на 1 ткани мозга (Ferkany et al., 1984). Важно, что распределение их по структурам мозга неравномерно, как ■ неодинакова их локализация в субклеточных фракциях нейронов. По-видимому, эти пептиды играют не только разную роль в мозговых образованиях, но и выполняют неоднозначные функции в разных компартментах клетки (Lim et al., 1981; Ländensmäki et al., 1980). Функциональное значение глутамилпептидов пока неизвестно, однако появились первые данные об участии этих пептидов ■ системных поведенческих эффектах. Предполагается также, что они играют регуляторную роль в метаболизме нервной системы, в частности принимают участие в транспортных процессах ■ утилизации нейромедиаторных аминокислот (Bernstein et al., 1985; Крыжановский, Глебов, 1983).

Нельзя не обратить внимание на данные об избирательном влиянии на поведенческие процессы многих гормональных регуляторных пептидов, например тахикининов, пептидов церулинобомбезинового ряда, содержащих на С-концевом участке молекул либо пироглутаминовую кислоту, либо глутамат (Клуша, 1984). Фрагменты С-концевых последовательностей этих гормонов, которые, как известно обладают наиболее высоким биологическим и иммунореактивным действием, могут оказаться источником появления разнообразных малых глутаматсодержащих пептидов. Именно динамичность накопления коротких пептидов ■ в то же самое время специфичность их строения и биологических свойств, по-видимому, лежит в основе регуляции эффективного взаимодействия между нейронами (Ifrench-Mullen et al., 1985).

Присутствие разных по структуре и функциям пептидов ■ одних ■ тех же клетках ■ волокнах, существование пептидов и классических нейромедиаторов в одинаковых терминалях указывает на сложность процессов, происходящих ■ синапсах мозга млекопитающих. Вместе с тем приведенные данные свидетельствуют ■ пользу включения глутаматергических систем ■ глутаматсодер-

жащих пептидов ■ обеспечение высшей нервной деятельности у млекопитающих.

В течение последнего десятилетия появились и стали успешно развиваться новые неинвазивные методы регистрации функциональных состояний головного мозга человека (позитронно-эмиссионная томография, ядерно-магнитный резонанс и гамма-сцинтиграфия и др.). Наиболее информативным среди этих методов является позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), позволяющая прижизненно регистрировать метаболизм разных органов и тканей, включая головной мозг. Это создает предпосылки для успешного изучения нейрохимических основ формирования функциональных состояний живого мозга человека, его наиболее сложной сферы деятельности — психической.

В настоящее время уже существуют хорошо разработанные приемы оценки функционального состояния нервной ткани с помощью изменения локального метаболизма глюкозы, CO_2 и кислорода, а также изучения обмена аминокислот или двухвалентных катионов в системе кровь—цереброспинальная жидкость, которые могут быть детектированы методом ПЭТ. Последний был применен ■ исследованиях как у экспериментальных животных, так и у здоровых волонтеров и больных с самыми разнообразными поражениями нервной системы (опухоли, двигательные расстройства, эпилепсия, травмы и др.). Изучение поглощения различных метаболитов тканью мозга позволяет получить ценную информацию для первичной радионуклеотидной диагностики и для выявления анатомической локализации очагов поражения. Немаловажное значение для установления картины заболевания и разработки способов его лечения имеет характер динамического превращения разнообразных терапевтических агентов, которые используются с лечебной целью, например при цереброваскулярных нарушениях, сосудистых ■ вегето-сосудистых дисфункциях головного мозга (Bagon et al., 1983, 1985).

Вместе с тем имеющиеся в литературе попытки сопоставить данные, касающиеся окислительно-восстановительных и биоэнергетических процессов в ткани мозга, и результаты организации разнообразных мозговых функций, включая поведенческие реакции у человека, пока не оправдали возлагавшихся на них надежд. Выявление локальных зон мозга, способных активироваться при выполнении сложных видов деятельности мозга человека, например психической, оказалось преждевременным. Так, в исследованиях Меттер и др. (Metter et al., 1982) были сопоставлены данные включения меченой флуорозедоксиглюкозы с региональной организацией речевой функции у 11 пациентов с частичной или полной афазией и здоровых доноров. На основании регистрации томографических изображений при предъявлении 12 специальных тестов испытуемым была сформулирована причастность каудальных ядер к механизмам возникновения речевых афазий независимо от функциональной активности зон Брока и фронтальной лобной коры. Однако точной локализации зон мозга, ответственных за прояв-

ление речевой функции, при изучении метаболизма производных глюкозы оказалось пока недостаточно. Возможно, в этом случае необходим подбор специфических маркеров — нейропептидов или нейрорецепторов, способных вовлекаться в формирование речевой функции.

Действительно, более информативными для изучения сложных функций мозга оказались разные типы рецепторов: дофаминовых (Wagner et al., 1983), бенздиазепиновых (Maziere et al., 1986), опиатных и др. (The metabolism... , 1985). Исследование вклада глутаматных рецепторов и глутаматсодержащих пептидов представляет перспективную задачу, которая несомненно будет поставлена исследователями, занимающимися комплексными проблемами мозга человека.

Следует, по-видимому, отметить, что изучение с помощью ПЭТ распределения одного из типов нейрорецепторов не может дать исчерпывающую информацию о вкладе медиаторных систем в организацию того или иного вида деятельности головного мозга. Очевидно, потребуются анализ вклада разных типов нейрорецепторов и нейропептидов в сложную химическую мозаику процессов, лежащих в основе формирования конкретной поведенческой реакции.

Дальнейшее усовершенствование регистрирующих устройств ПЭТ, которые могут детектировать одновременно самые разные короткоживущие радионуклиды, иммобилизованные на радиофармпрепаратах, введенных человеку, позволяет визуализировать сложные динамические процессы, которые происходят в головном мозгу при выполнении определенных видов деятельности, включая психические.

1.3. Вовлечение глутаматергических систем в механизмы патогенеза эпилепсии

Хорошие результаты при изучении патологических реакций мозга млекопитающих дает так называемый способ «химической» дегенерации нейронов, использующих глутамат в качестве нейромедиатора (Carthwaite et al., 1986a, b). Применяя различные структурные аналоги глутамата, можно сопоставлять происходящие изменения в медиаторных системах с поведенческими реакциями у животных. Некоторый материал могут дать наблюдения у больных с разными нейродегенеративными процессами.

Известно, что нейротоксический эффект самого глутамата значительно более скромнен по сравнению со структурными аналогами, особенно его циклическими производными, такими как каиновая, иботеновая кислоты и др., практически не утилизирующимися в клетках головного мозга (Köhler, Schwarcz, 1983). Еще менее выражен токсический эффект глутамата в мозгу у высших приматов и человека (Olney, 1981). Возможно, что этот феномен связан в большей степени с наличием у высокоразвитых

организмов систем поглощения и транспорта глутамата, который либо утилизируется, либо выводится из организма с помощью экскреторных органов. Локальные инъекции глутамата *in vivo* даже в сравнительно высоких дозах не вызывали значительных повреждений нейронов у взрослых организмов (Olney, 1969). Это положение было хорошо подтверждено и в экспериментах *in vitro*, в которых на срезах взрослого мозга были опробованы большие дозы глутамата в течение длительного периода. Даже концентрация глутамата в инкубационной среде около 3 мМ при аппликации в течение 2 ч вызывала лишь незначительный некроз нейронов, расположенных преимущественно на периферии среза (Balkar, Johnston, 1972). Очевидно, в ткани мозга имеется весьма эффективный механизм, который существенно ограничивает диффузию глутамата в нейронах (Charles, Chang, 1983).

В то же время вызывает интерес тот факт, что действие глутамата на срезы незрелого мозжечка приводило к быстрому изменению структуры нейронов и их гибели (Olney, 1971). Далее оказалось, что нейроны новорожденных крыс более чем в 10 раз чувствительнее к токсическому воздействию глутамата; нарастающее же в онтогенезе количество глиальных клеток значительно ослабляло этот эффект (Olney et al., 1972).

Очаговые поражения, вызываемые аппликацией глутамата или его структурных аналогов, часто сопровождаются симптомами эпилепсии. Наиболее ярко эти эффекты проявляются у эмбрионов и молодых животных, у которых, как полагают, процессы утилизации глутамата находятся в становлении, а гематоэнцефалический барьер, по-видимому, еще слабо функционирует (Olney, Price, 1981).

Эпилепсия представляет собой грозное нервно-психическое заболевание, этиология и патогенез которого во многом еще неясны (Погодаев, 1986). Одной из наиболее распространенных точек зрения на механизмы возникновения эпилепсии является гипотеза о нарушении баланса медиаторного метаболизма в головном мозгу, в том числе соотношения возбуждающего нейромедиатора — глутамата и тормозного — ГАМК (Мелдрум, 1982).

В литературе представлены многочисленные свидетельства, касающиеся участия глутамат- и ГАМКергических систем мозга в патогенезе и этиологии эпилепсии (Раевский, Георгиев, 1986). Клинико-биохимические определения количества глутамата и ГАМК в биологических жидкостях и биоптатах мозга (Поздеев, 1983) как будто подтверждают справедливость такой концепции, выдвинутой еще в 1935 г. (Adrian, 1935; Peggy, Hansen, 1981).

Между тем результаты подобных работ часто противоречивы в оценке корреляции между содержанием глутамата в биологических жидкостях больных эпилепсией и появлением у них выраженной судорожной активности. Обнаруживаются не только существенные индивидуальные различия в содержании медиаторных компонентов в биологических жидкостях у человека, но и имеются сложности в интерпретации полученных в клинике данных. Это

обусловлено тем, что дикарбоновые аминокислоты в качестве нейромедиаторов в количественном отношении составляют лишь крайне малую долю от общего содержания аминокислот в организме (Coutinho-Netto et al., 1981). Более того, применяемые в современной невропатологии способы терапевтического лечения, предположительно компенсирующие дефекты метаболизма пораженных медиаторных систем мозга, только в небольшом проценте случаев дают стойкие положительные эффекты (Бехтерева, 1980).

Естественно, что наряду с «медиаторными концепциями» обращает на себя внимание ряд других гипотез, в которых важная роль в патогенезе эпилепсии отводится нарушению функции мембранных компонентов нейронов, а также процессам аутоинтоксикации организма. Так, заслуживают внимания гипотезы об участии липидных компонентов нейрональных мембран в формировании судорожного состояния (Панченко и др., 1981), в том числе участия перекисного окисления липидов (Бурлакова и др., 1982) и вклада в эти процессы мембранных ганглиозидов (Аврова, Обухова, 1975).

Вполне обоснованно Мелдрум (Meldrum, 1981) предположил, что решающее значение в формировании эпилептической активности имеют не столько глутаматергические, сколько глутаматерцептивные пути ЦНС. Это предположение было подтверждено на моделях у животных при имплантации кобальтовых бляшек в сенсомоторную кору крыс (Croucher et al., 1982). Авторы показали, что антагонист синаптических глутаматных рецепторов — аминофосфоновалериановая кислота (APV) — при аппликации непосредственно на эпилептический очаг значительно уменьшал или полностью подавлял судороги у крыс. Высокоэффективное антисудорожное действие проявляли α -амино- ω -фосфонокарбоновые кислоты, конкурирующие с глутаматом за участки связывания на рецепторах центральных нейронов. Все эти аналоги глутамата в отличие от α -аминоадипиновой кислоты и диэтилового эфира глутаминовой кислоты подавляли приступы аудиогенной эпилепсии у мышей линии ДВА/2 (Simon et al., 1984) и пентилентетразоловые судороги у других грызунов. Исследователи подчеркивали важность ряда α -амино- ω -фосфонокарбоновых кислот в качестве основы для создания новых противосудорожных препаратов (Chapman et al., 1982; Meldrum, 1984).

Значительную роль глутаматным рецепторам в патогенезе эпилепсии отводят Бодри и Линч (Baudry, Lynch, 1980b), которые показали, что нарушение регуляции функции этого типа рецепторов приводило к синхронизации активности нейронов в гиппокампе и коре больших полушарий головного мозга. Эффекты посттетанической потенциации, наблюдаемые в этих структурах после электрического раздражения, эти авторы объясняли значительным повышением эффективности работы глутаматерцептивных синапсов (Baudry et al., 1980).

Таким образом, получены убедительные данные, свидетельствующие в пользу вовлечения глутаматных рецепторов в механизмы

гипервозбудимости нейрональных элементов и генерации эпилептиформных нарушений в головном мозгу млекопитающих.

Гипотеза о том, что возбуждающие нейрорецепторы аминокислот могут участвовать в механизмах патогенеза некоторых нейродегенеративных нарушений, возникла после пионерских работ Олни и его коллег (Olney, 1971; Olney et al., 1972) в начале 70-х годов. Наличие факторов «эндогенной токсичности» в организме, которые способны воздействовать на глутаматные рецепторы, связывали с появлением дегенеративных изменений, сопровождающих сенильную деменцию, снижение психических функций при хорее Гентингтона и шизофрении (Olney, Price, 1981). При этом в качестве эндогенной субстанции, способствующей появлению нейродегенеративных процессов, подразумевалась хинолиновая кислота, количество которой в головном мозгу, как оказалось, повышается с возрастом (Лапин, 1985).

Работами Мелдрума (Meldrum, 1982) было показано, что нейродегенеративные нарушения в гиппокампе мозга крыс возникают в результате нарушения метаболизма каротидных артерий, вызванного введением антагонистов глутаматных рецепторов. Автор полагает, что ишемические повреждения нейронов, появляющиеся в результате определенных форм аноксии, могут вызывать значительный выброс нейромедиаторов и активацию глутаматных рецепторов.

Другим известным нейротоксином, вызывающим блокаду глутаматергических путей в головном мозгу, является каиновая кислота, которая в 1000 раз активнее самой молекулы нейромедиатора. Интерес к действию каиновой кислоты обусловлен возможностью дегенерации нейронов, избирательно накапливающих глутамат, без повреждения проходящих или заканчивающихся в данной области мозга аксонов других нейронов (Johnston, 1980). Обнаружено, что микроинъекции каиновой кислоты в гиппокамп вызывали либо симптомы эпилепсии, либо — при введении в некоторые зоны полосатого тела — нарушения двигательной сферы, характерные для хорей Гентингтона и паркинсонизма (Левин, Сытинский, 1983).

Участие каиновой кислоты в генерировании эпилептических приступов у животных связывают с прямой деполяризацией нейронов, чувствительных к глутамату, сопровождающейся гибелью пирамидных нейронов гиппокампа. Считают, что этот эффект разрушает нейроны в результате интенсивных и продолжительных судорог, вызванных хронической чрезмерной стимуляцией глутаматных рецепторов (Davies, Watkins, 1981).

Высокотоксичным эффектом обладает каиновая кислота на лимбические структуры мозга, такие как миндалевидное ядро, таламус и лимбическая кора, вызывая эпилептиформные состояния у разных животных (Camprochiato, Coyle, 1978). Инъекции каиновой кислоты непосредственно в структуры мозга или ее системное введение вызывали сходные некротические изменения, развивающиеся последовательно во времени в разных подкорковых обра-

зованиях, сопровождавшиеся нарушением двигательной активности и появлением типичных эпилептических разрядов на ЭЭГ.

Это хорошо было проиллюстрировано в клинко-экспериментальных исследованиях с помощью метода ПЭТ (The metabolism... 1985).

При исследовании механизмов формирования судорожной активности у больных эпилепсией оказалось, что разные типы пароксизмальных приступов как увеличивали, так и уменьшали общий локальный энергетический метаболизм нервной ткани, которые регистрировали с помощью ПЭТ. Не было обнаружено количественных взаимосвязей между радиоактивным распределением метки в зонах и структурах мозга и ЭЭГ-активностью или поведенческими реакциями у обследованных пациентов (Engel et al., 1983; Theodore et al., 1985).

Вместе с тем изучение региональной фармакокинетики меченого ^{11}C -дифенилгидантоина (дилантина) у больных эпилепсией обнаружило ряд интересных фактов (Varon et al., 1983). Поступление радиофармпрепарата из крови в мозг происходило в течение 20—30 мин, распределение метки по структурам мозга не зависело от лечебного эффекта ДФГ: включение метки было одинаковым как у больных с хорошим терапевтическим действием, так и у больных с формами эпилепсии, резистентными к этому лекарственному средству. Авторы отмечают, что ПЭТ не позволила выявить конкретные анатомические области, ответственные за накопление препарата или проявление судорожной активности.

С другой стороны, некоторые корреляции между развитием судорожной активности и появлением типичных эпилептических разрядов на ЭЭГ были продемонстрированы с помощью ПЭТ у экспериментальных животных, которым были введены ^{11}C -дезоксиглюкоза на фоне нейротоксина глутаматергических связей в мозгу — каиновой кислоты.

Системная, или внутримозговая, инъекция каиновой кислоты приводила к резкому изменению локального энергетического метаболизма в ткани мозга почти исключительно в тех структурах мозга, в которых патологические изменения были максимально выраженными (Ben-Ari, 1981). В противоположность этому до введения каиновой кислоты радиоактивный материал концентрировался практически исключительно в гиппокампе и энториальной коре. Через час после введения каиновой кислоты радиоактивная метка распределялась в миндалине, терминалях полосатого тела, лимбической коре.

Эти наблюдения свидетельствуют о том, что интенсивная эпилептическая активность появляется при нейродегенеративных поражениях тех подкорковых структур, которые связаны между собой глутаматергической передачей. Поэтому можно предположить, что низкая эффективность исследований ПЭТ у больных эпилепсией связана с неточным подбором радиофармпрепаратов. С нашей точки зрения более пригодными для этой цели могли быть агонисты или антагонисты глутаматных рецепторов ЦНС. Вполне

объяснимо, что выбор большинства исследователей пал на соответствующие радиофармпрепараты, которые позволяют выявить определенные типы нейрорецепторов и визуализировать конкретные медиаторные пути в головном мозгу, включающиеся в тот или иной вид деятельности человека (Hägglund et al., 1987).

Можно представить, что принципиально новое направление в исследованиях функциональной организации мозговых процессов обеспечения высших функций у человека принадлежит в будущем методу позитронно-эмиссионной компьютерной томографии, позволяющей точно сопоставлять реальную динамику биохимических процессов в головном мозгу и поведенческие (нормальные или патологические) эффекты у животных и человека. Естественно, что при дальнейшей разработке этого метода встанет вопрос об адекватных маркерах, дающих возможность визуализировать конкретные биохимические реакции в нервной ткани и функцию нейрональных элементов. С этой точки зрения наиболее пригодными могут оказаться клеточные рецепторы и моноспецифические антитела к ним, которые уже начинают применять в подобных исследованиях у человека (Farde et al., 1985).

В последние годы резко возрос интерес к участию иммунологических процессов в патогенезе нервных и психических заболеваний, в том числе и эпилепсии (Aarli, Tönder, 1980). Постепенно благодаря развитию более совершенных клинко-иммунологических методов подтверждается правильность предположения, выдвинутого еще в начале века французским врачом (De Lezenne, 1900; цит. по: Mihailovič, Curič, 1973), который впервые показал возможность аутоиммунных нарушений при некоторых формах эпилепсии.

Большинство исследователей согласно с мнением, что системная инфузия антимозговых антител в организм животных не вызывает эпилептизации мозга, по-видимому, за счет наличия высокоэффективных систем нормального функционирования гематоэнцефалического барьера. Введение же антимозговых антител непосредственно в мозг животных приводило к характерным изменениям биоэлектрической активности мозга, наблюдаемым при эпилепсии (Штарк, 1978, 1985). Инъекция нормальных иммуноглобулинов снижала спонтанную биоэлектрическую активность лишь на очень короткий срок, в то время как антимозговые антитела после начальной депрессии биоэлектрических сигналов вызывали длительные спорадические спайки и высоковольтные остроконечные волны, переходившие в эпилептические судороги (Bassanini et al., 1982).

Вместе с тем антигенная направленность выявленных аутоантител изучена крайне слабо. Особое внимание в связи с вышесказанным приобретают данные о нарушении мембранных компонентов нейрональных элементов, участвующих в генезе гипервозбудимости ткани мозга. Показано, например, что интравентрикулярная и субдуральная инфузия антисыворотки с высоким титром к синаптическим мембранным фракциям головного мозга или к моз-

говым ганглиозидам индуцировала фокальную спайковую активность и даже судорожные припадки. Ни нормальные иммуноглобулины, ни ганглиозиды, адсорбированные на альбумине, не индуцировали описанный феномен (Mihailovič, Cupić, 1980).

Пока неизвестно, какие эпилептогенные свойства антител к мембранным белкам обусловлены конкретным индивидуальным антигеном или антигенами, входящими в состав мембранных компонентов. В этом направлении в настоящее время ведутся активные исследования. Так, Карпиак с сотр. (Karpiak et al., 1976) получила кроличью антисыворотку к синаптической фракции мембран мозга крыс, содержащую смесь разнообразных антигенов. Для того чтобы выяснить роль каждого антигена в формировании судорожной активности, была предпринята попытка выделить и очистить индивидуальные мембранные антигены. Были получены фракции очищенных ганглиозидов мембран, преимущественно Gm₁, на которые вырабатывались антитела, индуцирующие эпилептиформную активность мозга (Karpiak et al., 1981).

Расширение возможностей методического характера, а именно появление высокочувствительных радиоиммунологических и иммуноферментных методов, дали новый импульс в исследованиях мозговых антигенов и аутоантител к ним при заболеваниях ЦНС (Семенов и др., 1973; Семенов, Семенова, 1984).

В кровяном русле больных эпилепсией постоянно обнаруживаются разнообразные по структуре и биологическим свойствам циркулирующие иммунные комплексы (ЦИК), титр которых в большинстве случаев коррелирует с тяжестью симптоматики (Карлов и др., 1985). Так, у больных эпилепсией нейроинфекционной этиологии выявлен достоверно повышенный уровень содержания ЦИК как в период эпилептического статуса, так и во время серии эпилептических припадков (Шматько и др., 1984). Особенно важно то, что повышение количества ЦИК отмечается до появления и развития судорог, причем соотношение противомозговых антител и антигенов мозга в этих циркулирующих комплексах изменяется в разные фазы предсудорожного и судорожного цикла. Купирование судорожных припадков с помощью медикаментозной терапии существенно снижало содержание ЦИК и постепенно нормализовало его величины, свойственные здоровым донорам, сопровождаясь улучшением соматического состояния больных эпилепсией.

Вместе с тем до сих пор остается открытым вопрос о вкладе глутаматных рецепторов ЦНС в развитие аутоиммунного процесса при эпилепсии. Такую возможность следует предусмотреть в связи с последними данными, касающимися механизмов патогенеза ряда заболеваний у человека, в основе которых лежат аутоантитела к клеточным рецепторам (Harrison, 1983). Так, существует множество доказательств, что аутоантитела к никотиновым рецепторам играют роль в этиологии и патогенезе миастении гравис (Tsartos et al., 1981, 1982). Вентер и сотр. (Venter et al., 1982, 1984) показали, что аутоантитела к α_2 -адренорецепторам вызывают у пациентов аллергический ринит и астму. Антитела к инсулиновым ре-

цепторам были обнаружены у пациентов с резистентными формами диабета (Лейбуш, Бондарева, 1982).

Поскольку в клинике эпилепсии пока отсутствуют надежные биохимические данные оценки функционального состояния головного мозга, кроме анализа медиаторных компонентов, предположительно участвующих в механизмах патогенеза эпилепсии (Поздеев, 1983), нами была предпринята попытка к изучению возможной взаимосвязи между нарушением функции глутаматных рецепторов и процессами аутоиммунизации организма больных эпилепсией.

Постановка такой задачи была обусловлена необходимостью разработки новых биохимических показателей, способных объективизировать состояние больных на ранних стадиях заболевания и, что особенно важно, выявить возможности определения группы риска по данному заболеванию. Наиболее актуально решение этой задачи было для психоневрологических диспансеров, включая детские медицинские учреждения, а также для тех областей медицины, которые были непосредственно связаны с необходимостью обследования и отбора лиц, направляемых для работы в экстремальных условиях.

Результаты комплексного обследования больных эпилепсией и титра аутоантител к глутаматным рецепторам головного мозга у этих больных выявили ряд интересных закономерностей. Прежде всего четко выявлялась корреляция уровня накопления аутоантител в крови больных и формы длительности и характера судорожных припадков. Оказалось, что в крови больных эпилепсией с генерализованными или серийными судорожными приступами количество аутоантител к специфическому белку головного мозга в 6—8, а иногда и в 10 раз превышало контрольный уровень их у здоровых доноров и больных другими формами неврологических заболеваний. У лиц с единичными смешанными эпилептическими судорогами содержание аутоантител колебалось в пределах 2—3-кратного превышения над фоном. Иногда такой повышенный уровень наблюдался у родственников, больных наследственными формами эпилепсии, или пациентов, перенесших нейрохирургические вмешательства, у которых на ЭЭГ не регистрировалась эпилептичность. Таких пациентов, по нашему мнению, можно было отнести к группе повышенного риска по данному заболеванию, которые нуждались в специальном медицинском наблюдении и профилактических терапевтических мероприятиях.

Возможность вовлечения глутаматных рецепторов в процессы гипервозбудимости ткани мозга именно при эпилепсии подтверждается фактами иного порядка. Так, интересные наблюдения были сделаны нами при неврологическом обследовании детей с разными заболеваниями эндокринной системы, у которых нередко наблюдались симптомы эпилептичности: появление судорожных или предсудорожных состояний. В этих случаях возникала необходимость уточнить первичный диагноз и проверить наличие диагноза эпилепсии у этих пациентов. Анализ крови детей на содержа-

ние аутоантител к глутаматным рецепторам показал, что практически у всех пациентов титр аутоантител не превышал норму, определяемую в контрольных анализах крови доноров. Появление судорожных компонентов в клинике эндокринных заболеваний, как выяснилось в ходе комплексного неврологического осмотра, не связано с диагнозом эпилепсии. Эти данные хорошо подтверждаются электроэнцефалографически. С другой стороны, у детей с первичным диагнозом эпилепсии, характеризующимся появлением на ЭЭГ выраженных компонентов эпилептической активности, наблюдалась четкая корреляция между диагнозом и высоким титром аутоантител во всех исследованных случаях.

Указанная тест-система для определения в крови пациентов аутоантител к глутаматным рецепторам может служить дополнительным объективным критерием степени органического поражения мозга, в частности возбудимых глутаматчувствительных путей в ЦНС. Данный клиничко-биохимический анализ крови пациентов может оказаться полезным в комплексном обследовании пациентов: при отборе данных анамнеза, неврологического осмотра, нейрофизиологического, психического и рентгенологического методов исследования. Использование указанной тест-системы в сочетании с другими методами и в динамике заболевания позволяет применить адекватную терапию противосудорожными средствами на том или ином этапе заболевания, а также корректировать аутоиммунные нарушения с помощью иммуногемоперфузии и плазмафереза.

В последние годы появились доказательства того, что различные патологические изменения структуры и функции рецепторов являются ведущим патогенетическим звеном нарушения функционального состояния той или иной ткани.

Суммируя эти данные, можно с достаточной долей уверенности предсказать, что специфические для конкретного органа или ткани типы хеморецепторов на мембране клеток способны не только характеризовать функциональное состояние организма, но и могут служить в качестве соответствующих маркеров структурных поражений тех органов и тканей, для которых они являются ведущими. Аутоантитела, выработанные на поврежденные мембранные компоненты, в большинстве случаев являются, по-видимому, «свидетелями» иммунной реакции организма, возникающей для утилизации и вывода последних из кровотока. Это может привести к длительному персистированию или циркуляции аутоантител к рецепторным компонентам. Системная длительная биоконверсия аутоантител в организме должна отразиться на их свойствах: могут появляться их «агрессивные» качества, которые приводят к разрушению клеток, имеющих повышенное сродство к аутоантителам.

Аналогичный подход для изучения антигенной направленности антимозговых аутоантител развивают Полетаев и др. (1985, 1986, 1987). Согласно их концепции, в крови больных шизофренией, эпилепсией и рассеянным склерозом обнаруживаются аутоантитела к ряду нейроспецифических белков ткани мозга, например к мем-

белкам, разделенным по рН с шагом 0.5 ед., белкам S-100, кальмодулину и основному белку миелина. Однако в 75—80 % случаев независимо от антигенной направленности аутоантител и нозологической формы заболевания обнаруживали повышенные титры к белкам S-100. За этим исключением спектры аутоантител характеризовались качественным своеобразием. Это говорит о том, что при указанных заболеваниях имеются различные наборы антигенов-мишеней, поражаемых аутоантителами. С другой стороны, факт наличия аутоантител к белкам S-100 во многих случаях свидетельствует о нарушении метаболизма глиальных и синаптических процессов, для которых этот белок является характерным. Возможно, дальнейшие поиски антигенной направленности аутоантител и более совершенная очистка специфических нейрорецепторных белков могут оказаться полезными для более точного анализа молекулярных основ соответствующих форм психопатологии.

Дальнейшее развитие иммунодиагностики хронических заболеваний нервной системы, психических болезней может оказаться полезным для раннего выявления деструктивных процессов в тех зонах мозга человека, которые протекают с повреждением различных клеточных структур: нейронов, глии, миелина, оболочек и сосудов мозга. Вполне закономерно, что возможным лечебным приемом являются методы нейтрализации или утилизации эндогенных токсинов, в частности аутоантител. Причем качество и количество аутоантител в крови больных позволяет обосновать дополнительные детоксикационные мероприятия в клинике нервных болезней и служить критерием эффективности при проведении гемосорбции, гемодиализа или плазмефереза.

1.4. Некоторые аспекты эволюции рецепторов глутамата

Функциональные особенности процесса химической передачи информации от одного нейрона к другому или от нейрона к эффекторной клетке определили совокупность требований веществу, которое должно выступать посредником. В общем виде эти требования сводятся, по-видимому, к обеспечению специфичности и необходимой скорости передачи дискретных сигналов при высокой степени их надежности (Ата-Мурадова, 1983). Причем весьма вероятно, что в ходе эволюции химического принципа синаптической передачи имел место «экономический» фактор: затраты энергии на передачу единицы информации должны были быть сведены к разумному минимуму.

Естественно предположить, что, как только вещества, осуществляющие межклеточные контакты, приобретали характер сигнала, одновременно на реагирующих на них клетках появлялись особые структуры, способные с ними взаимодействовать. Другими словами, в эволюции должен был происходить параллельно процесс создания специфических клеточных рецепторов, сопряженных с системами утилизации медиаторов.

Вполне понятно, что проблемы формирования химической чувствительности, в том числе к глутамату, в филогенезе имеют немало нерешенных проблем. Это в полной мере относится и к становлению глутаматных рецепторов. Наличие глутаматчувствительных систем в нервно-мышечных синапсах и глутаматрецептивных нейронах во всем царстве животных — от наиболее примитивных существ (плоские черви) до приматов и человека — поднимает важные проблемы появления информационных систем в различных биологических объектах. Так, до сих пор неясно, насколько древним в филогенетическом аспекте является глутаматрецептивный нейрон, организованы ли глутаматные рецепторы беспозвоночных так же, как и у позвоночных, имеются ли общие черты в становлении и организации хеморецепторов для разных нейромедиаторов, а именно ацетилхолина и глутамата, и, наконец, какие закономерности лежат в основе систем, обеспечивающих высокую скорость химической передачи отдельных сигналов. Решение этих вопросов в настоящее время еще далеко от полного понимания, но необходимость и важность их рассмотрения не вызывает сомнения.

Ацетилхолин и глутамат — наиболее простые низкомолекулярные медиаторы, синтез и утилизация которых для клетки «энергетически выгодны». Оба этих нейромедиатора появляются в двух главных филогенетических линиях — у вторичноротых, включающих иглокожих и всех позвоночных, и у первичноротых, представленных многообразием червей, моллюсков и членистоногих (Kelle, 1977).

Интересно отметить, что именно эти нейромедиаторы обеспечивают в ходе эволюции высокую скорость передачи информации, требующую исключительно жестких временных и пространственных ограничений. Весьма вероятно, что эти процессы обусловлены некоторыми общими чертами функциональной и структурной организации холинорецепторов и глутаматных рецепторов.

Известно, что дикарбоновые аминокислоты являются древнейшими источниками появления жизни на Земле и обнаружены в значительных количествах еще в продуктах абиогенного синтеза. Полагают, что постепенное усложнение регуляторной роли глутаминовой и аспарагиновой кислот привело к становлению их нейромедиаторной функции. Возможно, что эта функция явилась отражением усложнения «нужд» клеток и их объединений.

Чувствительность живых организмов к аминокислотам, и в частности к глутамату, сформировалась на самом раннем этапе эволюции. Так, уже на уровне одноклеточных организмов наблюдается высокая избирательность рецепторных систем по отношению к отдельным стимулам. Например, для *E. coli* наиболее сильным аттрактантом является L-аспарагиновая кислота (порог рецепции $3 \cdot 10^{-8}$ М), чувствительность к другим аминокислотам была ниже (Hedblom, Adler, 1983). Было обнаружено, что хемотаксис у бактерий сопровождается метилированием клеточных мембранных белков, в частности рецепторов аспартата (De Franco, Koshland, 1980). Применение методов генной инженерии по-

зволило Кошланду и соавт. (Koshland, Russo, 1983) выделить ген мембранного белка с молекулярной массой 60 кДа, обладавшего высоким сродством к аспартату, и показать, что усиленный синтез этого рецептора вызывает поведенческие изменения у *Salmonella typhimurium*. Следует отметить, что глутамат оказывал лишь слабое ингибирующее действие на связывание аспартата с рецептором у бактерий. Подобная избирательность активных центров рецепторов аспартата практически не выявлялась у других более сложных организмов, включая нейроны позвоночных.

Эволюционное возникновение медиаторной функции глутамата происходило, по-видимому, постепенно по хорошо отработанной схеме метаболизма этой аминокислоты в клетке. Мало вероятно, что в ходе эволюции для этой цели появился бы внезапно новый тип медиатора со своей биохимической системой синтеза, разрушения и утилизации (Михельсон, Зеймаль, 1970). Если это верно, то можно найти у широкого отряда живых организмов примитивные системы, «узнающие» и «транспортирующие» глутамат, на самых разных ступенях развития, в том числе у микроорганизмов, одноклеточных и простейших (Koshland, Russo, 1983).

Действительно, наряду с вовлекающимися в хемотаксис рецепторами на плазматической мембране обнаружены другие белки, обладающие сродством к аминокислотам. В частности, из мембраны солюбилизовали белковый переносчик глутамата. При встраивании этого белка в фосфолипидную искусственную мембрану он осуществлял высокоаффинный транспорт радиоактивного глутамата в условиях градиента Na^+ (Tsuchiga et al., 1982).

Система транспорта глутамата обнаружена в мембране риккетсий *Coxiella burnetii* (Hackstadt et al., 1983). В этих бактериях транспорт аминокислоты целиком определялся градиентом ионов H^+ . Как выяснилось, обнаруженная рН-зависимая система транспорта глутамата была очень чувствительна к метаболитическим разобщителям (типа 2,4-динитрофенола). Впоследствии подобные системы сохранились на мембранах митохондрий у многоклеточных организмов.

Становление «регулирующей» функции глутаматсвязывающих систем, т. е. усложнение структурных компонентов глутаматных рецепторов, произошло, очевидно, на более поздних ступенях эволюции — у представителей филогенетической линии первичноротых животных, к которым относятся кишечнополостные, насекомые, моллюски и ракообразные.

В отличие от позвоночных, у которых медиаторная функция глутамата сосредоточена преимущественно в ЦНС, у беспозвоночных глутаматергические синапсы встречаются как в центральных, так и периферических отделах нервной системы.

Нейроны, возбуждаемые при аппликации L-глутамата, обнаружены у наиболее примитивных многоклеточных организмов — кишечнополостных. В изолированном препарате орального сфинктера актинии *Actinia equina* определены миллимолярные концентрации глутамата (Carlyle, 1974). Концентрация этой аминокис-

лоты повышалась при электрической стимуляции препарата. Стимулирующее действие глутамата на сокращение мышц было специфичным по отношению к другим аминокислотам.

У кольчатых червей возбуждающее действие глутамата продемонстрировано на клетках Ретциуса, входящих в сегментальные ганглии пиявок (James et al., 1980).

Контактные хеморецепторы, реагирующие на ряд аминокислот, в числе которых находится глутамат, обнаружены у обитающих в воде беспозвоночных (моллюсков и ракообразных), а также многих пластинчатожаберных и костистых рыб (Walker et al., 1981). С помощью электрофизиологических подходов выявлены клетки, обладающие высокой чувствительностью к L-глутамату (пороги 10^{-6} — 10^{-8} М), но, как правило, характеризующиеся небольшой субстратной специфичностью к другим аминокислотам (Акоев и др., 1980; Roberts, Walker, 1982).

Особенности функционирования глутаматных рецепторов обнаружены в нейронах моллюсков. Изолированные нейроны из окологлоточного ганглия улитки *Planorbargius cognatus* давали как деполяризующий, так и гиперполяризующий ответы на аппликацию L-глутамата (Гапон, Самойлова, 1982). Два типа ответов были обнаружены на клетках околопищевого ганглия морского моллюска *Onchidium venustum* (Oomura et al., 1974). Интересно, что оба типа рецепторов глутамата опосредовали тормозное действие глутамата: один (ассоциированный с K^{+} -проводимостью) — продолжительное, а другой (ассоциированный с каналами для Cl^{-}) — кратковременное (Miyashashi, 1984).

У родственных *Onchidium* моллюсков *Aplysia* и *Helix* на нейронах нашли уже несколько типов глутаматных рецепторов: возбуждающие (изменяющие проницаемость для Na^{+} и K^{+}) и тормозные (для Cl^{-}), а также смешанные разновидности ответов на нейромедиатор. Глутаматные рецепторы этих нейронов обладают уникальными свойствами. Обнаружено, что растительный лектин конканавалин А (КонА) полностью блокировал десенситизацию рецепторов, причем общий деполяризующий ответ нейрона не зависел от того, какой ответ регистрировали изначально. «Новый» ответ глутаматных рецепторов мог индуцироваться даже при аппликации КонА в течение 30 с и был специфичен только для глутамата, а не его структурных аналогов (Nistri, Constanti, 1979). Кехое (Kehoe, 1978) предполагает, что происходит латеральная диффузия и перегруппировка молекул рецептора на мембране за счет «стягивания» мембранных гликопротеинов этим лектином и образования «кэпов» — каналов сверхпроводимости.

Другой особенностью хеморецепции моллюсков является отсутствие резких различий в активности стереоизомеров глутамата и структурно родственных ему аминокислот (Сологуб и др., 1982). Например, реакция нейронов буккального ганглия *Aplysia* потенцируется L-глутаматом и L-аспартатом (McGreely, Carpenter, 1984). Поэтому ряд исследователей ставят под сомнение медиаторную функцию глутамата в этих биологических системах и об-

суждают возможность его модуляторного эффекта (Saito et al., 1985). Однако последние, хотя и немногочисленные, работы по биохимии глутаматных рецепторов у моллюсков свидетельствуют в пользу наличия у них участков связывания радиоактивного глутамата, сходных по своим характеристикам с некоторыми типами каинатных и квисквалатных рецепторов, выявляемых в центральных синапсах позвоночных (Rin et al., 1986).

Обнаружено, что белковый гидролизат, существенным компонентом которого являются свободные аминокислоты, стимулирует пищевое поведение у многих ракообразных (Barber, 1961). Так, на ходильных ножках и антеннулах омара найдены хеморецепторы, проявляющие высокую чувствительность к глутамату (порог чувствительности $3.5 \cdot 10^{-9}$ М) (Hayes, Barber, 1982). На основе выявленной узкой специализации рецепторов (величина ответа на другие испытанные вещества не превышала 8 % от зарегистрированной при аппликации глутамата) сформулировано предположение о существовании клеток — «вкусовых специалистов» на хеморецепторных органах ракообразных (Bauer et al., 1981).

Кислые дикарбоновые аминокислоты являются одним из самых адекватных обонятельных стимулов у хордовых. У них выявлены 4 типа аминокислотных рецепторов: для кислых (глутамата и аспартата) — А тип, для основных (аргинина и лизина) — В тип, для нейтральных аминокислот с короткой цепью — С тип и для аминокислот с длинной боковой цепью — Д тип (Derby, Atema, 1982). Предполагают, что обонятельные рецепторы аминокислот у рыб могут быть тождественны системам их активного транспорта у простейших, связанных с градиентами Na^+ и H^+ (Johnston, Atema, 1983).

У амфибий, ведущих как водный, так и наземный образ жизни, чувствительность обонятельной системы характеризуется изменением спектра воспринимаемых стимулов в сторону более летучих соединений. Тем не менее чувствительность к аминокислотам, особенно L-глутамату и L-аспартату, у отдельных видов амфибий сохраняется, однако вопрос о существовании специализированных глутаматных рецепторов здесь, как и у большинства амфибий, остается пока не решенным (Johnston et al., 1984).

У наземных животных рецепторы аминокислот в периферической нервной системе сосредоточены не только в обонятельных органах, но и в зрительной системе (сетчатке и зрительных нервах) самых разных представителей животного мира (Carpio, Derby, Atema, 1982; Byrd, 1984).

Несмотря на выявление глутаматных рецепторов у разных биологических видов, пожалуй, только применительно к нервно-мышечному синапсу членистоногих можно судить с достаточной степенью достоверности об участии рецепторов глутамата в синаптической передаче.

Этому способствовали не только классические работы Ашервуда (Usherwood, 1977, 1984), Кул-Канди (Cull-Candy et al., 1981, 1982, 1987), Мандельштама (1977, 1983) и Магазаника (1984),

но и появившиеся данные о специфических блокаторах для глутаматных рецепторов насекомых в составе яда пауков семейства *Aganidae* (Yoshioka et al., 1984). Было обнаружено, что ионные механизмы, лежащие в основе чувствительности нервно-мышечных синапсов беспозвоночных, отличаются от моллюсков и других представителей животного мира. Оказалось, что синаптические токи в данном случае обусловлены главным образом проведением ионов Na^+ внутрь мышечной клетки, очень малым вкладом ионов Ca^{++} и отсутствием проведения ионов K^+ и Cl^- . Потенциальные возбуждающие агенты, действующие на центральные нейроны позвоночных, например каиновая, иботеновая и L-гомоцистеиновая кислоты, были неактивными в отношении нервно-мышечной передачи у кузнечиков и саранчи (Usherwood, 1978). Поэтому для беспозвоночных, так же как и позвоночных, были предложены два основных типа рецепторов глутамата: синаптические и внесинаптические (Briley et al., 1981). Внесинаптические рецепторы глутамата обладали высокой чувствительностью к известным структурным аналогам L-глутамата.

Наиболее перспективным в исследовании структурных компонентов нервно-мышечных соединений у беспозвоночных является применение токсинов, которые могут оказаться весьма информативными для сравнительного анализа функционирования глутаматных рецепторов в разных филетических линиях и объектах.

В яде паука *Nephila clavata* были обнаружены высокоселективные ингибиторы глутаматных рецепторов ракообразных, которые необратимо блокировали возбуждающие постсинаптические потенциалы на нервно-мышечном соединении омара (Kawai et al., 1982). Эффект этого ингибитора был воспроизведен также на пирамидных нейронах гиппокампа крыс (Saito et al., 1985a), что свидетельствует о сходности структурных компонентов глутаматных рецепторов мышечных и нейрональных мембран. Характерно, что как в том, так и в другом случаях блокировались лишь ответы на L-глутамат, но не на аспартат. Ни одно из ранее испытывавшихся фармакологических соединений не обладало подобной селективностью.

Не исключено, что обнаруженный блокатор рецепторов глутамата идентичен нейротоксину — аргиопину, выделенному Гришиным и сотр. (1986) из яда паука *Argiopa lobata*. Аргиопин обратимо блокировал глутаматактивируемые каналы в нервно-мышечных синапсах личинок мухи при низких концентрациях ($K_d = 5-6 \cdot 10^{-7}$ М) (Магазаник и др., 1986). Ашервуд и др. (Usherwood et al., 1984) идентифицировали низкомолекулярные компоненты яда пауков *Argiopa trifasciata* и *Arganeus gemma*, которые ингибировали глутаматвозбудимые сокращения мышц саранчи. Ранее, используя тот же подход и токсин, содержащийся в яде паука *Argiopa lobata* (Ташмухамедов и сотр., 1983, 1984), выделили из мышц тараканов и крабов функционально активный мембранный белок, специфически связывающий L-глутамат.

Результаты перечисленных работ показывают, что на всем протяжении филогенеза от низших организмов до млекопитающих,

несмотря на ряд различий, прослеживаются также и элементы сходства синаптической передачи. Это позволяет использовать разные виды беспозвоночных для изучения молекулярных процессов, происходящих в глутаматрецептивных синапсах.

Существенно, что у представителей высших звеньев эволюции глутаматные рецепторы, так же как и рецепторы ацетилхолина, становятся более специфичными и избирательными для ионов, и большей степени для ионов Na^+ . Возрастает и усложняется система регуляции функции рецепторов. Например, для глутаматных и холинорецепторов характерно появление и филогенезе медленно входящих кальциевых токов, циклических нуклеотидов и эндогенных факторов пептидной природы (Этингоф, 1987). Очевидно, это связано с возникновением дополнительных функций у нейронов, обеспечивающих более сложные формы организации и функционирования нервной системы у высших млекопитающих.

Появились первые исследования молекулярной эволюции клеточных рецепторов. Так, в недавно опубликованной работе (Ven-ter, Fraser, 1984) показано, что ацетилхолиновые и адренорецепторы имеют общие гомологичные структурные компоненты, входящие, как полагают авторы, в молекулярную организацию любых типов мембранных рецепторных белков. Представлены первые иммунохимические свидетельства идентичности холинорецепторов мозга человека и дрозофилы. По данным сравнительного анализа, полученного с помощью моноклональных антител, предполагается, что мускариновый тип холинорецепторов не подвергался изменениям за последние несколько миллионов лет.

Суммируя вышеприведенные данные, можно заключить, что формирование химической чувствительности к глутамату также, по-видимому, является эволюционно более ранним свойством живых организмов, сопоставимым по времени с появлением холинорецепторов, а возможно, возникшим еще раньше. Сравнительно-физиологический анализ и онтогенетический подход к раз-виту глутаматрецептивных систем свидетельствует об олиго-меризации структуры рецепторного комплекса в сторону посте-пенного усложнения функций. Как видно, для низших организмов было характерно неупорядоченное «хаотичное» распределение отдельных молекул глутаматных рецепторов, в то время как в процессе эволюционного развития наблюдаются процессы объединения нескольких субъединиц в сложные мембранные комплексы, способные организовать высокоскоростные каналы «сверхпроводимости» для катионов. Аналогичные процессы проис-ходят и для других нейромедиаторов, например ацетилхолина (Сергеев, Шимановский, 1986). Практически все нейромедиаторы, включая глутаматные рецепторы, формируются и усложняются в ходе эволюции за счет олигомеризации или появления дополни-тельных регуляторных механизмов, достигая «зрелости», т. е. многообразия функций в головном мозгу млекопитающих и осо-бенно у человека.

2.1. Глут млекопит глутамат

Главным

аторных систем в
доступность и надеж
для выявления интер
нейронов. В некоторы
медиаторы, что справ
ых медиаторных сист
метаболитами, напри
головного мозга визу
и иммуногистохимичес
В отличие от дру
и глицин участвуют и
всех клеток, в связи с
соответствующих синап
не обнаружено специф
может помочь в определ
матерических связей в
или его ферментных ме
судить о природе синап
включающие измерение
окончаний стимулируемы
ление постсинаптических
1984), в частности выявл
стам или антагонистам гл
ниями, касающимися пред
зующих кислые аминокисл
диаторов. В обзоре Фостера
результаты изучения глута
(табл. 1). Авторы представ
времени путей в головном
мат: (рис. 3).

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ГЛУТАМАТСВЯЗЫВАЮЩИХ УЧАСТКОВ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ГОЛОВНОГО МОЗГА

2.1. Глутаматергические пути головного мозга млекопитающих и локализация глутаматных рецепторов в нейронах

Главным требованием картирования каких-либо медиаторных систем в головном мозгу млекопитающих является доступность и надежность специфических маркеров, необходимых для выявления интересующих исследователя связей в популяции нейронов. В некоторых случаях маркерами служат сами нейромедиаторы, что справедливо главным образом для катехоламинных медиаторных систем или ферментных систем с уникальными метаболитами, например ГАМК. В этих случаях медиаторные пути головного мозга визуализируются с помощью гистохимических и иммуногистохимических методов (Rainbow et al., 1982).

В отличие от других нейромедиаторов глутамат, аспартат и глицин участвуют и в метаболических процессах практически всех клеток, в связи с чем выбор специфических маркеров для соответствующих синапсов весьма затруднен. Так, для глутамата не обнаружено специфического ферментного маркера, который может помочь в определении структурно-пространственных глутаматергических связей в головном мозгу. Обнаружение глутамата или его ферментных метаболических систем еще не позволяет судить о природе синапса. В этом случае используют критерии, включающие измерение высвобождения глутамата из нервных окончаний стимулируемых клеток или, что более надежно, выявление постсинаптических рецепторов для глутамата (Foster, Fagg, 1984), в частности выявление чувствительности нейронов к агонистам или антагонистам глутамата (McLennan, 1983).

Последние годы характеризовались интенсивными исследованиями, касающимися предположительных путей в ЦНС, использующих кислые аминокислоты в качестве возбуждающих нейромедиаторов. В обзоре Фостера и Фэгга (Foster, Fagg, 1984) обобщены результаты изучения глутаматергических путей головного мозга (табл. 1). Авторы представили схему известных к настоящему времени путей в головном мозгу, которые чувствительны к глутамату (рис. 3).

Глутаматергические связи хорошо изучены в гиппокампе — подкорковой структуре, ответственной за выполнение сложных интегративных функций. В ранних экспериментах, проведенных Надлер и др. (Nadler et al., 1978a), было показано, что разрушение участков энториальной коры и перерезка перфорантного пути гиппокампа у крыс приводит к значительному поглощению глутамата нервными окончаниями в молекулярном слое зубчатой извилины. При этом поглощение ГАМК и активность глутаматдекарбоксилазы — фермента, синтезирующего этот нейромедиатор, практически не изменялись. Обнаружено, что в этом случае уменьшение высвобождения глутамата является специфичным и не сопровождается изменениями концентрации аспартата в молекулярном слое (Nadler et al., 1978b).

Недавние исследования с использованием фармакологических подходов (Wheal, Miller, 1980) также свидетельствовали в пользу глутаматергических связей между волокнами перфорантного пути и молекулярного слоя зубчатой извилины.

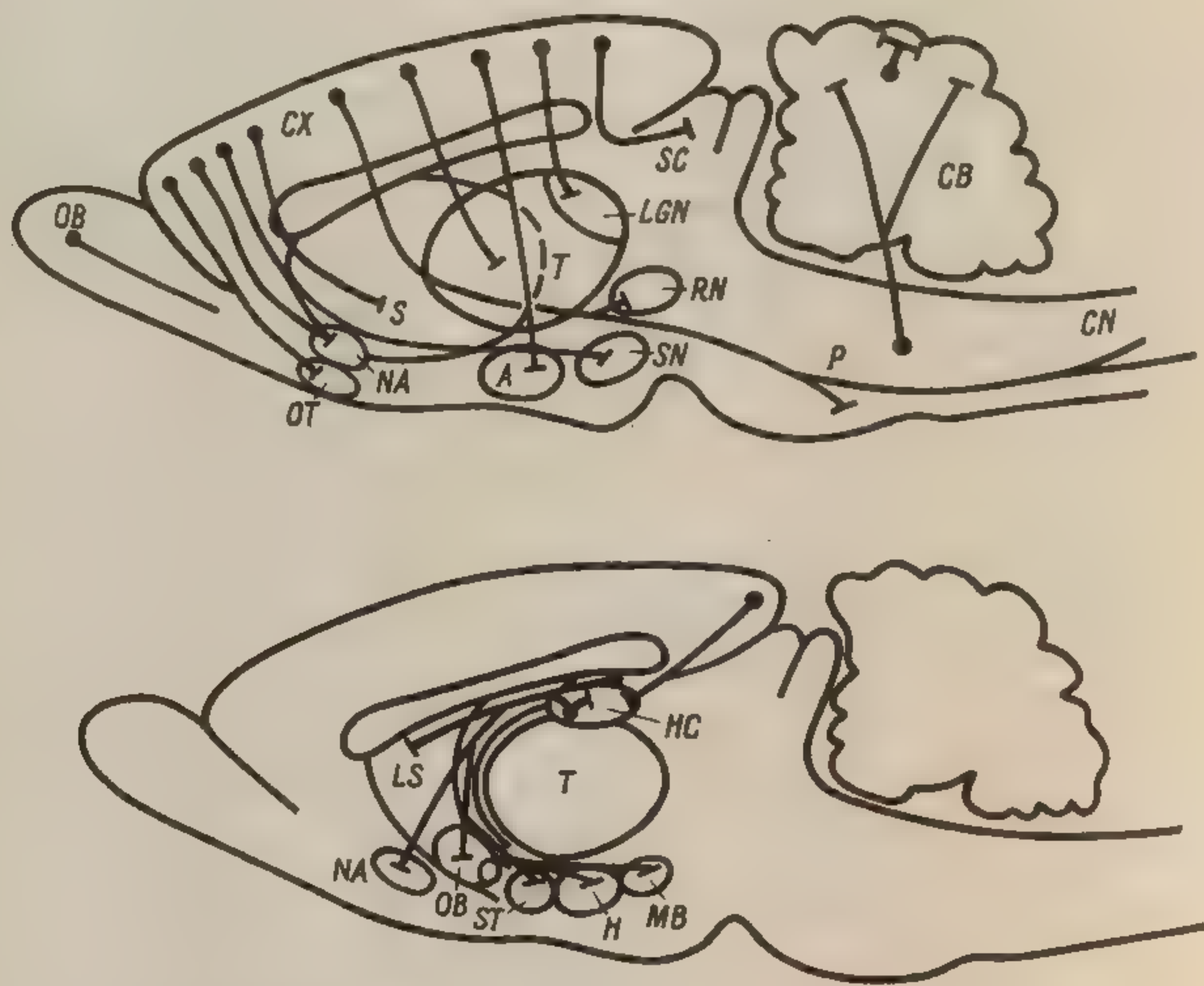


Рис. 3. Глутаматергические пути в ЦНС млекопитающих (по: Foster, Fagg, 1984).

A — миндалина; CB — мозжечок; CN — клиновидное ядро продолговатого мозга; колленчатое тело; LCN — латеральная перегородка; LS — латеральные вестибулярные ядра; MB — маммиллярные тела; NA — прилежащее ядро; OB — обонятельная луковица; OT — обонятельный бугорок; P — мост; PN — красное ядро; S — стриатум; SC — верхний таламус; SN — черная субстанция; ST — терминальная полоска; T —

Нервные пути.
(Foster, Fagg, 1984 с изменениями)

Нервные пути	С
Слуховой нерв	+
Мозжечок	+
Лазящие волокна	+
Параллельные волокна	+
Кортикофугальные пути	—
К миндалине	—
Клиновидному ядру	—
Продолговатому мозгу	—
Зубчатой извилине	—
Латеральному колленчатому телу	—
Прилежащему ядру	—
Обонятельному бугорку	—
Ядрам моста	—
Красному ядру	—
Спинному мозгу	—
Стриатуму	—
Черной субстанции	+
Таламусу	—
Гиппокамп	—
Коммиссуральные волокна	—
Коллатерали	—
Шейфера	—
Связи гиппокампа с терминальной	—
Полоской	+
Гипоталамусом	+
Латеральной перегородкой	+
Маммиллярными телами	+

Таблица I

Нервные пути, чувствительные к глутамату в головном мозгу млекопитающих
(Foster, Fagg, 1984 с изменениями)

Нервные пути	Доказательства глутаматергической и глутаматчувствительной природы, основанные на критериях				
	пресинаптических			постсинаптических	
	С	П	В	И	Ф
Слуховой нерв	+	—	+	—	+
Мозжечок	+	+	+	—	+
лазающие во-	+	+	+	—	+
локна					
параллельные	+	+	+	—	+
волокна					
Кортикофугаль-					
ные пути					
к миндалине	—	+	—	—	
клиновидному					
ядру					
продолгова-	—	+	—	—	+
тому мозгу					
зубчатой из-	—	+	+	—	+
вилине					
латеральному	—	+	—	—	—
коленча-					
тому телу					
прилежащему	—	+	—	—	—
ядру					
обонятель-	—	+	—	—	—
ному бу-					
горку					
ядрам моста	—	+	+	—	—
красному	—	+	—	—	—
ядру					
спинному	—	+	—	—	—
мозгу					
стриатуму	+	+	+	—	+
черной суб-	—	+	—	—	+
станции					
таламусу	—	+	—	—	+
Гиппокамп					
комиссураль-	—	+	+	—	+
ные во-					
локна					
коллатерали	—	—	+	+	+
Шеффера					
Связи гиппо-					
кампа с					
терминальной	+	+	—	—	—
полоской					
гипоталамусом	+	+	—	—	—
латеральной	+	+	+	—	—
перегород-					
кой					
мамилляр-	+	+	—	—	—
ными те-					
лами					
прилежащим	+	+	—	—	—
ядром					

Таблица 1 (продолжение)

Нервные пути	Доказательства глутаматергической и глутаматчувствительной природы, основанные на критериях				
	пресинаптических			постсинаптических	
	С	П	В	И	Ф
Латеральный обонятельный тракт	+	—	+	—	+
Спинной мозг					
нисходящие волокна	+	+	+	—	—
вставочные нейроны	+	—	—	—	+
первичные афференты	+	—	+	+	+

Примечание. В число пресинаптических критериев доказательства включали: определение поглощения экзогенного медиатора (П), измерение содержания глутамата в пресинаптической области (С) и определение стимулированного высвобождения медиатора (В). Постсинаптические критерии: идентичность действия эффекту естественного медиатора (И) и фармакологического (Ф).

Сравнительно хорошо изучены пути, осуществляющие связи коры больших полушарий и подкорковых структур, например кортикостриарный путь. Хирургическое удаление или перерезка фронтальной коры у крыс приводит к избирательному снижению поглощения глутамата в неостриате и не изменяет метаболизма холинергических, дофаминергических и ГАМКергических систем (Luini et al., 1983).

Авторадиографические исследования с использованием L-³H-аспартата определили, что нисходящие пути от пирамидного 5-го слоя коры заканчиваются большей частью в нигростриатных дофаминергических клетках. Показано, что большинство клеток стриатума являются глутаматчувствительными, в том числе расположенные в дорзальной части хвостатого ядра (рис. 3).

Исследование кортикофугальных путей главным образом с помощью авторадиографии и разрушения какого-либо пути обнаружило наличие аминокислот-нейромедиаторов во многих проекциях (табл. 1). Так, было показано, что глутаматергические проекции наблюдаются в таламусе (Fonnum et al., 1981a). Зрительная кора проецируется на латеральное коленчатое тело и верхние холмы четверохолмия (Bromberg et al., 1981). Как представлено на рис. 3, проекции фронтальной коры достигают черной субстанции, а зоны передней и задней коры взаимодействуют с миндалиной, соматосенсорной — с красным ядром, ядрами моста, клиновидным ядром продолговатого мозга, а также шейными и поясничными отделами спинного мозга (Fonnum et al., 1981b).

Анализ нервных путей, использующих в качестве нейромедиатора глутамат, показывает, что глутаматергические и глутамат-

рецептивные нейроны широко распространены практически во всех областях головного мозга млекопитающих. Это свидетельствует о несомненной важности этого типа медиаторной передачи для деятельности головного мозга.

Дальнейшие исследования локализации глутаматных рецепторов в синапсах нейрональных элементов тесно связаны с поиском специфических маркеров, способных выявлять рецепторные структуры на мембранах клеток мозга. Глутаматные рецепторы можно обнаружить с помощью иммуно-электронно-микроскопического подхода, основанного на использовании меченых моно- или поликлональных антител. Этот подход уже широко используется для визуализации других типов синаптических мембран нейронов (Newsomdavis et al., 1982).

Нами совместно с Ю. В. Бобрышевым и Ю. В. Балабановым была сделана попытка выявить локализацию глутаматных рецепторов в дифференцирующих органотипических культурах ткани мозга и выяснить ультраструктурные характеристики формирующихся глутаматрецептивных синапсов с помощью меченых электроноплотных маркеров и моноклональных антител (МКАТ), полученных к глутаматсвязывающим мембранным белкам (ГМБ) головного мозга крыс (Дамбинова и др., 1987а).

Проведенное исследование показало, что в органотипических культурах коры головного мозга первыми элементами, которые мигрируют в зону роста из эксплантата, являются глиобласты. Их выселение сопровождается изменениями формы клеток и образованием отростков. После установления межклеточных контактов наблюдается контактное торможение и последующая дифференцировка клеток. Первоначально образуется глиальная сеть из мультиполярных клеток, а затем многослойные структуры. В 17-дневной культуре ткани коры были выделены три зоны, отличающиеся друг от друга по морфофункциональным особенностям и поведению глиальных клеток: зона роста, промежуточная и центральная. Зона роста характеризуется постоянным перемещением и модификацией глиальных клеток, участвующих в формировании клеточных сетей и пластов. Преобладающими клетками этой зоны являются глиобласты. Промежуточная зона состоит из многослойных глиальных элементов, отличающихся высокой пролиферативной активностью. Центральная зона, в которой находятся нейроны и нейропил из многочисленных отростков, характеризуется высокой степенью дифференцировки глиальных производных. Центральная часть эксплантата снаружи покрыта эпителиоморфным слоем глиальных клеток, преимущественно из плазматических и фиброзных астроцитов. Таким образом, структурный анализ дифференцировки клеток в органотипической культуре ткани мозга новорожденных крыс показал, что данная модель является удобным объектом для изучения механизмов формирования глутаматрецептивных синапсов в онтогенезе.

На основе изучения свойств МКАТ к ГМБ было предположено, что они узнают антигенные детерминанты глутаматсвязывающих

центров рецептора и способны изменять физиологическую функцию глутаматных рецепторов нервной системы (Дамбинова и др., 1987а, б). Из полученных результатов следует, что выделенные и очищенные МКАТ к ГМБ могут служить специфическим маркером глутаматвозбудимых путей в головном мозгу млекопитающих (Дамбинова и др., 1985).

Действительно, иммуно-электронно-микроскопическое исследование показало, что МКАТ к ГМБ выявил наличие специфических структур исключительно в центральной зоне культуры коры головного мозга, преимущественно в зоне нейропиля (рис. 4, а). Меченные коллоидным золотом антитела располагались в виде кластеров на плазматических мембранах аксонов дифференцирующихся нейронов. В случае контактов отростков нервных клеток с нейропилем можно было наблюдать распределение меченных коллоидным золотом антител вдоль контактирующих плазматических мембран (рис. 4, б). Присутствие меченных антител наблюдали также в зоне контакта аксонов с «телами» нервных клеток (рис. 4, в). Проведенный анализ позволил выявить зоны сборки глутаматных рецепторов в цитоплазме клеток. Так, отложения меченных коллоидным золотом антител зарегистрированы в области отшнуровки везикул от дистальных частей цистерн пластинчатого комплекса (рис. 4, г), а также в везикулах конуса роста нейронов (рис. 4, д). Структурный анализ распределения глутаматных рецепторов в культуре коры головного мозга показал, что они выявлялись исключительно на мембранах дифференцирующихся нейронов и отсутствовали на поверхности глиальных элементов. Следует отметить, что отложений меченных коллоидным золотом антител не зарегистрировано ни на поверхности глиобластов зоны роста, ни на плазматических и фиброзных астроцитах центральной зоны эксплантатов. Аналогичные результаты были получены при исследовании образцов, заключенных в аралдит после инкубации эксплантатов с МКАТ к ГМБ.

Суммируя полученные в данной работе результаты, можно сделать следующие выводы. МКАТ к глутаматсвязывающим мембранным белкам головного мозга крыс обладают способностью выявлять глутаматные рецепторы на срезах органотипических культур головного мозга млекопитающих. Глутаматные рецепторы располагаются преимущественно в виде кластеров на плазматических мембранах дифференцирующихся нейронов и их аксонов. Зоной сборки глутаматных рецепторов является пластинчатый комплекс. Возможно, полностью или частично собранные рецепторы транспортируются к плазматической мембране нейронов посредством везикулярного транспорта. Встраивание рецепторов глутамата в плазматические мембраны может осуществляться в зоне конуса роста аксона.

Совокупность приведенных данных свидетельствует о том, что МКАТ к ГМБ позволяют решить проблему визуализации глутаматрецептивных связей в центральной нервной системе и топографию рецепторов глутамата в одной единственной клетке. Откры-

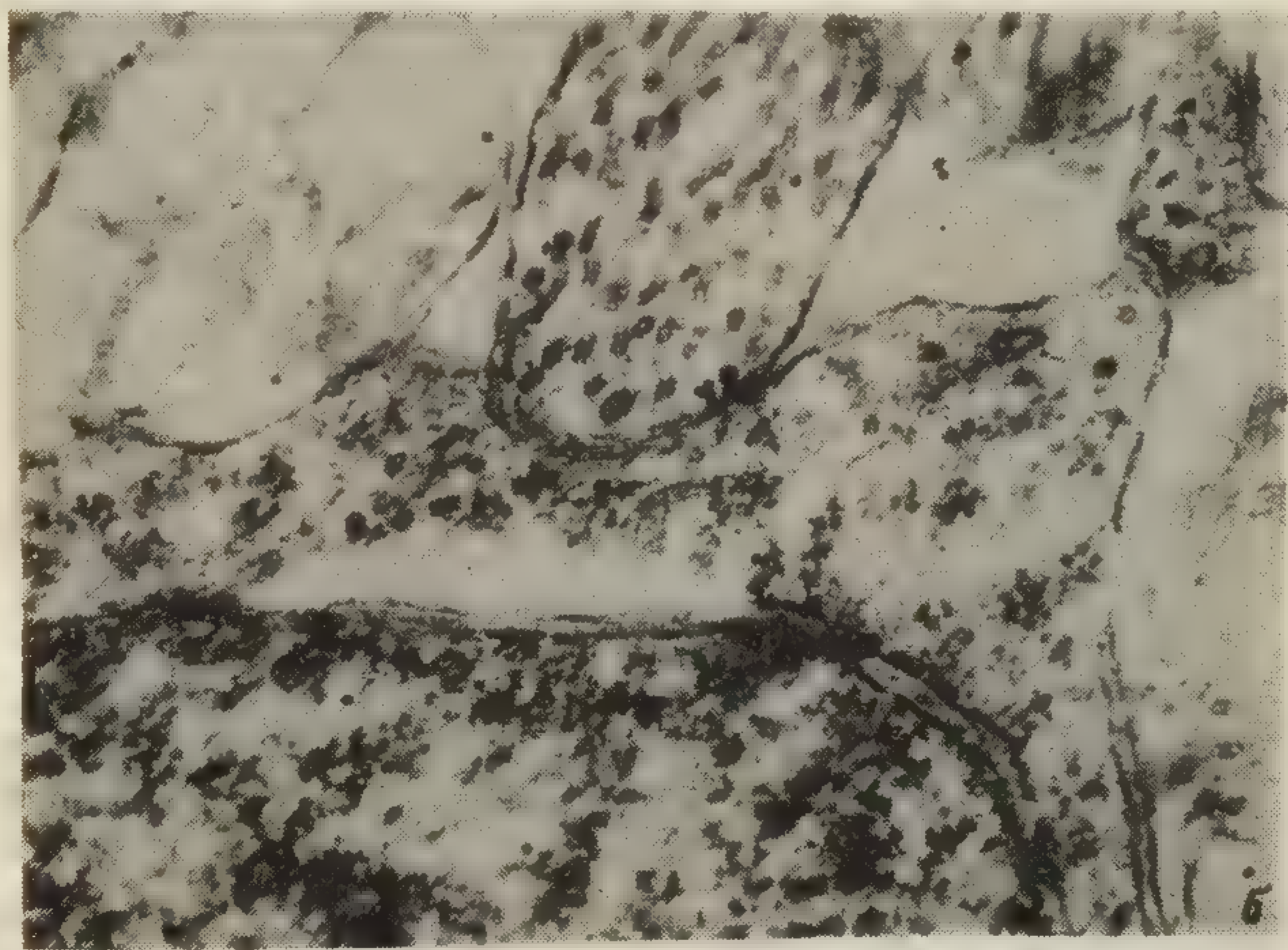
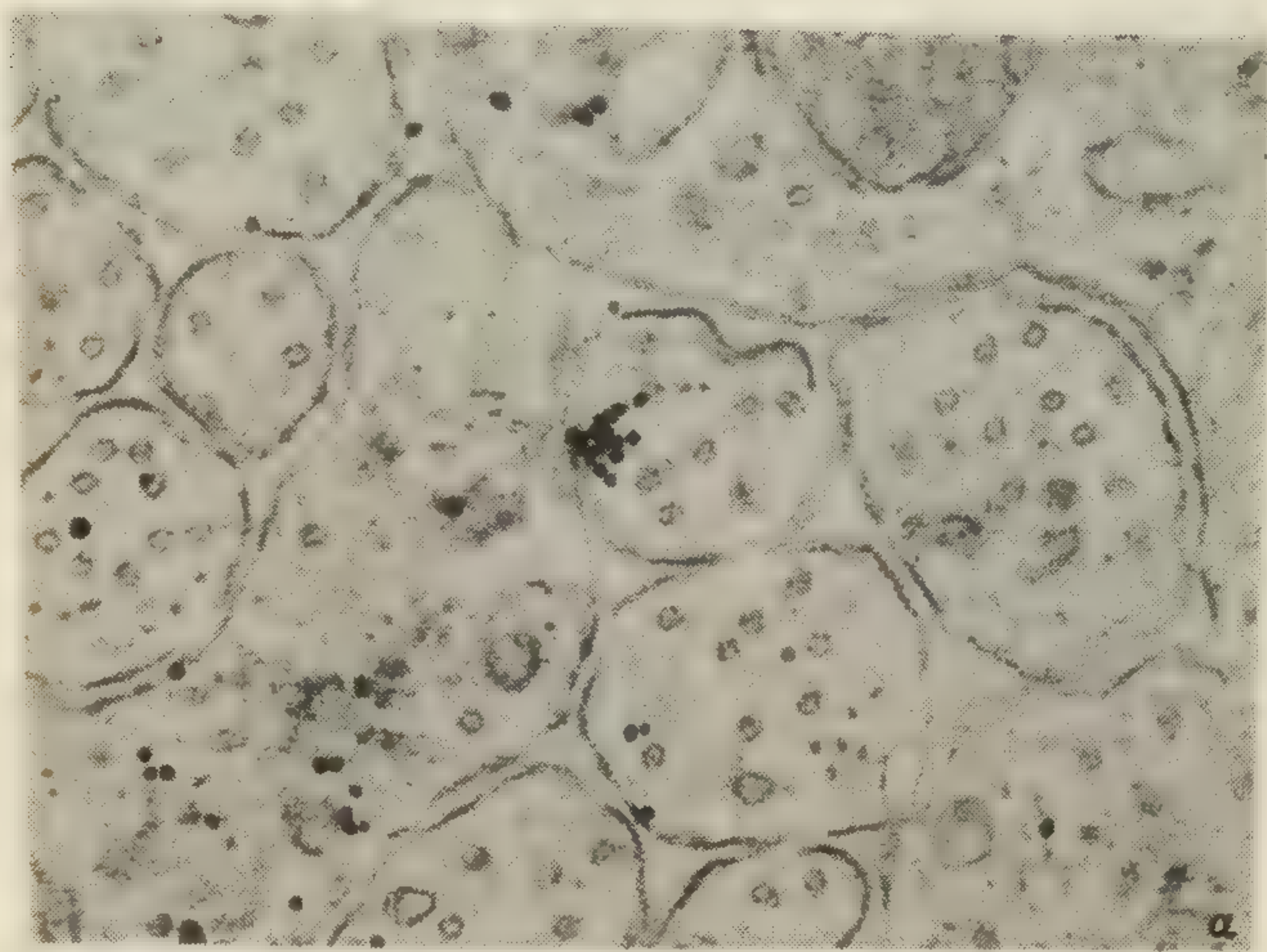


Рис. 4. Ультраструктурная локализация глутаматных рецепторов на нейронах культуры головного мозга крыс.

а — локализация меченных коллоидным золотом моноклональных антител к глутаматным рецепторам на аксоне дифференцирующегося нейрона в нейропиле культуры. $\times 85000$.
б — фиксация меченных коллоидным золотом антител вдоль плазматических мембран контактирующих отростков нервных клеток. $\times 100\ 000$.

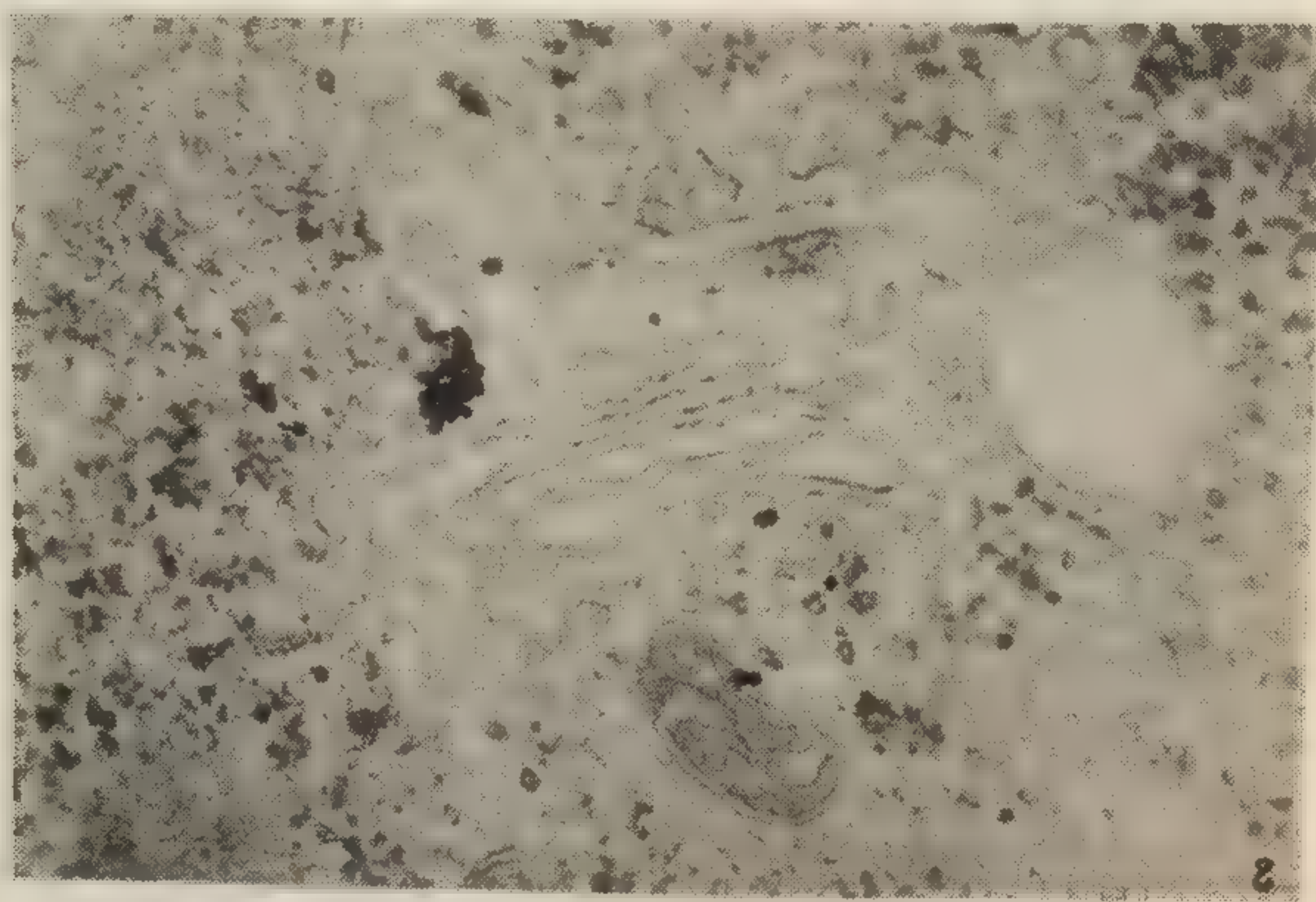
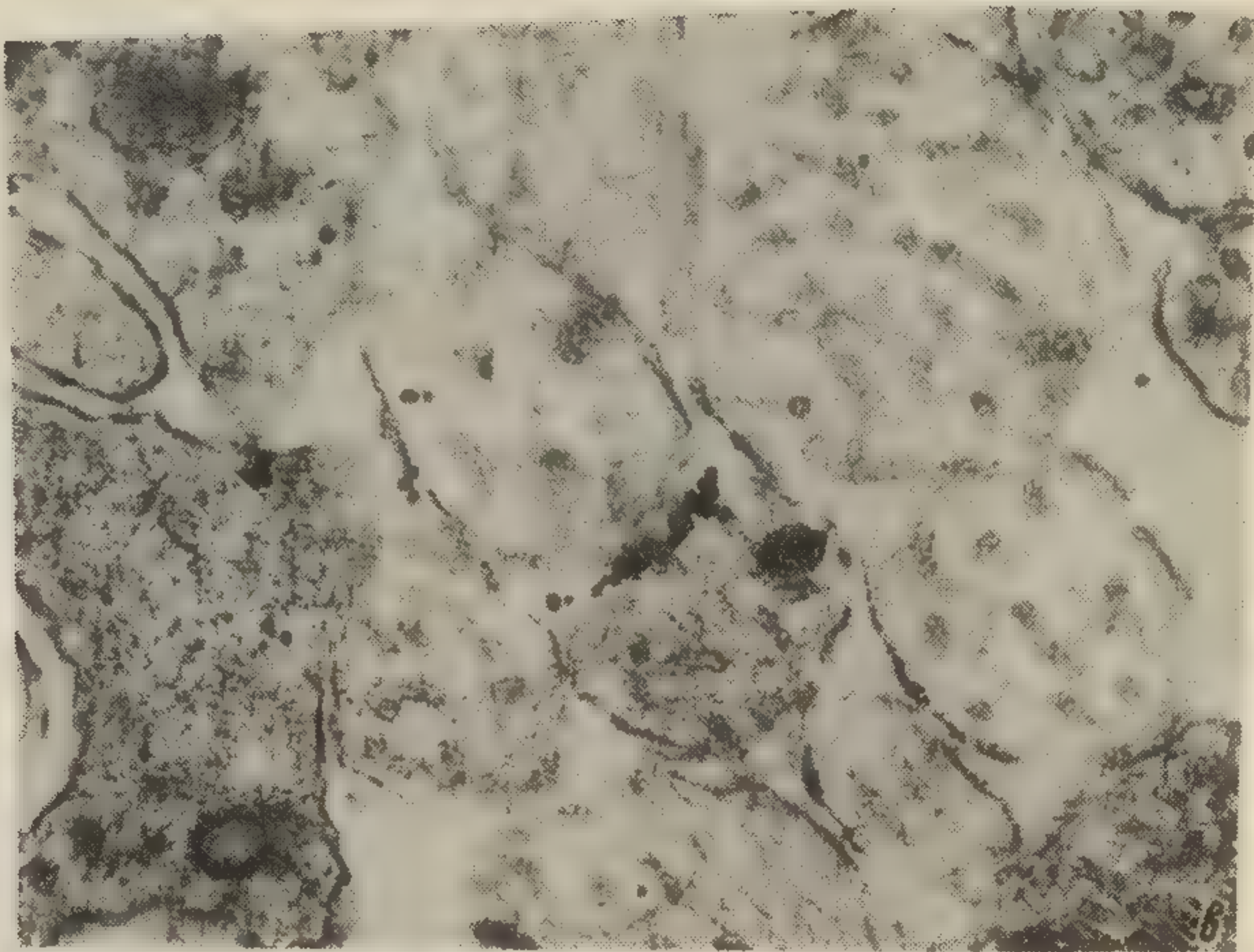


Рис. 4 (продолжение).

■ — локализация меченых антител в зоне контакта аксона с телом нервной клетки. $\times 35\ 000$. \square — отложение меченых антител в зоне отшнуровки везикул от цистерн пластинчатого комплекса. $\times 110\ 000$.

Рис. 4 (продо

д — локализация
лами конуса роста а

вающиеся метаболиты глутаматрецепторов, а также с помощью лондонным золотым стандартом изучения мозга, в том что

2.2.

C Me

ВЛИЯ

В последние годы в литературе по проблемам транснационального бизнеса появились работы, посвященные анализу деятельности транснациональных корпораций (ТНК) в развивающихся странах. В частности, в 1974 году Роберт Робертс (Robert Roberts, 1980) опубликовал книгу, в которой он показал, что ТНК играют важную роль в развитии развивающихся стран, но при этом также создают проблемы, связанные с их деятельностью. Робертс утверждает, что ТНК являются источником капитала, технологий и менеджмента, которые необходимы для развития развивающихся стран. Однако, он также отмечает, что ТНК могут создавать проблемы, связанные с их деятельностью, такие как загрязнение окружающей среды, нарушение трудовых прав и монополизация рынка.

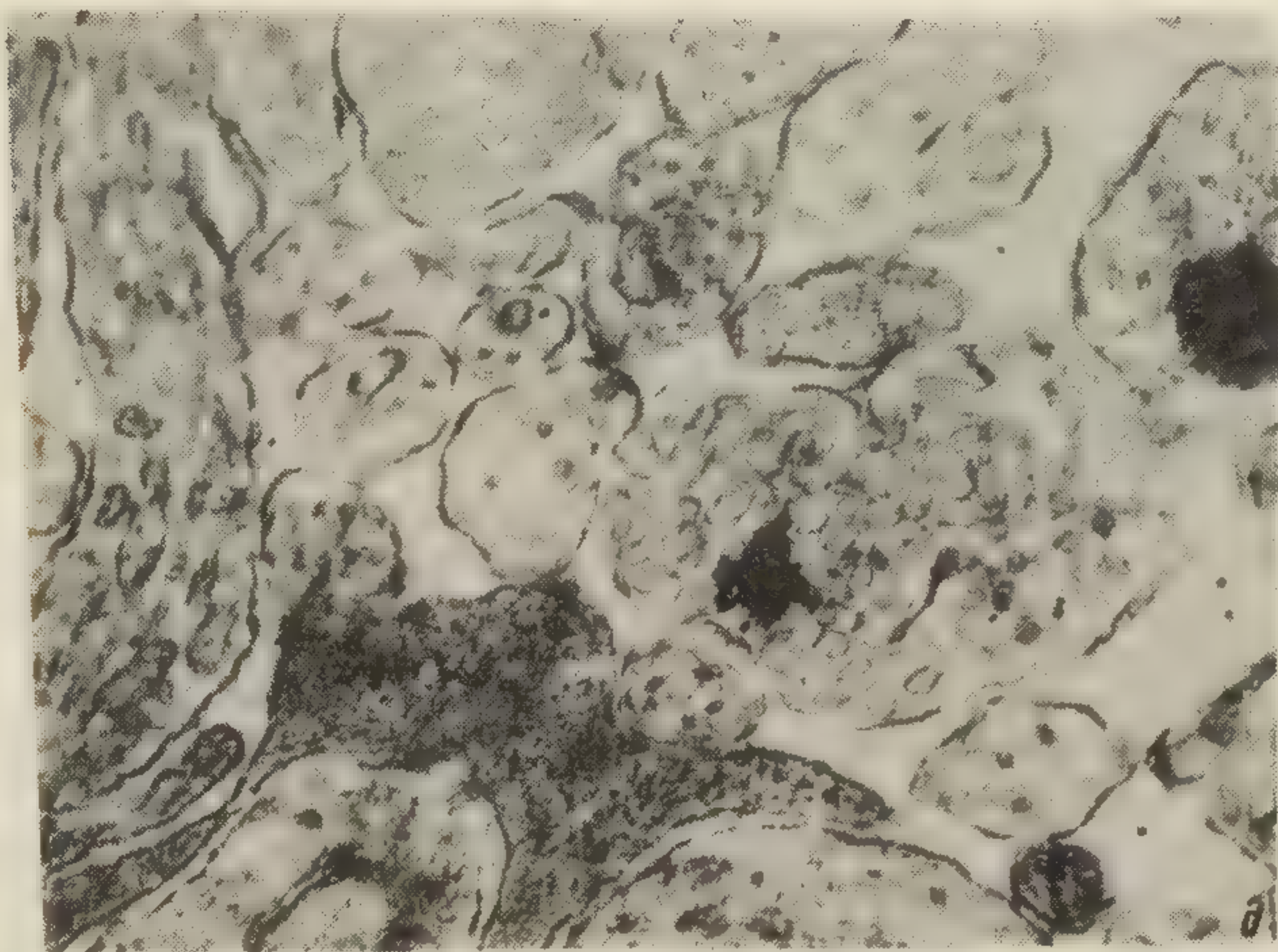


Рис. 4 (продолжение).

д — локализация меченных коллоидным золотом антител в зоне заполненного везикулами конуса роста аксона. $\times 65\ 000$.

вающиеся методические возможности изучения ультраструктуры глутаматрецептивных синапсов с использованием меченных коллоидным золотом МКАТ могут оказаться полезными для дальнейшего изучения принципов и механизмов деятельности головного мозга, в том числе и при заболеваниях нервной системы.

2.2. Рецепторное связывание L-³H-глутамата с мембранами нервных клеток: влияние катионов Na⁺ и Ca²⁺

Впервые возможность связывания L-глутамата с синаптическими мембранами (СМ), выделенными из коры больших полушарий головного мозга крыс, независимо друг от друга показали Робертс (Roberts, 1974) и Михаэлис (Michaelis et al., 1974). С тех пор многочисленными исследованиями были уточнены характеристики рецепторного связывания глутамата и представлены доказательства отличия этого процесса от избирательного транспорта и поглощения этой аминокислоты в синапсе.

В настоящее время принято считать, что истинное рецепторное связывание является Na⁺-независимым процессом, в то время как поглощение и транспорт нейромедиатора из синапса происходят в присутствии высоких концентраций ионов натрия (Sharif, Roberts, 1980).

Хид и соавт. (Head et al., 1980) определили наличие глутамат-связывающей активности, независимой от ионов Na^+ , в большинстве зон мозга кошки. Эта активность повышалась в следующем порядке: миндалины > гиппокамп > зрительная кора = таламус = полосатое тело = мозжечок > дорзальная часть моста = продолговатый мозг > спинной мозг.

По данным Бодри и Линча (Baudry, Lynch, 1981a), количество рецепторных Na^+ -независимых участков связывания глутамата изменяется в сторону уменьшения в ряду: лобная кора > теменная кора > затылочная кора > полосатое тело > гиппокамп > средний мозг > гипоталамус > мозжечок > продолговатый мозг.

Количественные параметры связывания глутамата с синаптическими мембранами разных структур головного мозга рассчитаны для немногих зон. Это обстоятельство обусловлено сложностью и трудоемкостью выделения материала из определенных структур мозга. Однако для основных структурных зон мозга константы диссоциации комплексов рецептор—медиатор (K_d) и количество связывающих участков ($B_{\text{макс.}}$) уже установлены. Эти данные, касающиеся количественных параметров связывания глутамата с синаптическими мембранами разных структур мозга, суммированы в работе Фостера и Фэгга (Foster, Fagg, 1984).

Из таблицы 2 видно, что у разных авторов имеется существенный разброс значений K_d и $B_{\text{макс.}}$ при исследовании одних и тех же структур мозга. Эти различия превышают неизбежный разброс данных, обусловленных как особенностями применяемых методик, так и структурной локализацией глутаматсвязывающих участков. Вероятнее всего, это обстоятельство объясняется несовершенностью методов унификации препаратов синаптических мембран, используемых при радиолигандном способе (Sharif, Roberts, 1980b).

Анализ данных, представленных в таблице, свидетельствует о том, что в разных структурах мозга млекопитающих обнаружены преимущественно гомогенные участки связывания глутамата. Очевидно, последние характеризуют однотипные рецепторные популяции, связывание глутамата с которыми не зависит от Na^+ .

Весьма оправданно возникают вопросы: являются ли эти Na^+ -независимые участки связывания соответствующими физиологическими рецепторами медиаторного связывания L-глутамата на мембране нейрона? Имеются ли подобные участки и на мембранах глиальных клеток?

Для того чтобы ответить на эти вопросы, следует рассмотреть данные, касающиеся онтогенетического развития рецепторов глутамата.

Наиболее интересными в этом плане являются исследования Бодри и Линча (Baudry et al., 1981), которые проанализировали взаимосвязи появления физиологической функции глутаматных рецепторов и развитие глутаматсвязывающей активности в онтогенезе.

Хорошо изученным с этой точки зрения является гиппокамп.

Гиппокамп обладает сравнительно простой анатомической организацией, и его интенсивно используют как модельную систему для изучения развития мозга млекопитающих. Появление Na^+ -независимых участков связывания L-глутамата в гиппокампе было обнаружено в течение первых 10 дней жизни крыс. За это время измеряемое связывание радиоактивного глутамата возрастало в гиппокампе приблизительно в 40 раз и коррелировало с появлением функционирующих глутаматергических синапсов в этой структуре. Количество связывающих участков изменялось вплоть до 9-го дня постнатального развития, а затем резко снижалось. Как предполагают авторы, это явление обусловлено значительным синтезом общего количества белков нейронных и глиальных элементов, в частности, оно совпадает по времени с миелинизацией нервных волокон. Существенное накопление глутаматсвязывающих участков перед периодом высокого синтеза белков в глии подтверждает предположение, что эти участки не локализованы на глиальных клетках.

Исследования, проведенные на мозжечке крыс (De Barry et al., 1983), подтвердили эту гипотезу. Время появления глутаматсвязывающих участков существенно замедлено в мозжечке по сравнению с гиппокампом, что совпадает с формированием синапсов в мозжечке. К такому же выводу пришли Сандерсон и Мерфи (Sanderson, Murphy, 1979), которые изучали формирование рецепторов глутамата в коре больших полушарий головного мозга крыс в онтогенезе. Они обнаружили, что большинство глутаматсвязывающих участков появляется в период пика синаптогенеза.

Большое внимание вызывают проведенные недавно исследования, выявившие разные типы рецепторов глутамата в ходе онтогенеза и их локализацию в синаптической и внесинаптической областях нейрона (Baudry et al., 1983). Было показано, что гиперчувствительность клеток гиппокампа появляется в ходе онтогенеза и в результате денервации комиссуральной деафферентации нейронов гиппокампа. Оказалось, что денервация вызывает эффект дополнительного появления глутаматных рецепторов типа G_2 , которые имеют внесинаптическую локализацию и связаны с явлениями гиперчувствительности мембраны нейрона при денервации. Было предположено, что другой тип глутаматных рецепторов G_1 является истинно синаптическим и совпадает по срокам со временем формирования основных синаптических связей в гиппокампе.

На основании рассмотренных данных можно заключить, что появление глутаматсвязывающих участков отражает в некоторой степени функциональное созревание глутаматных рецепторов в ходе онтогенеза. Отсутствие этих типов рецепторов в глиальных клетках и других клетках организма, а также их субклеточная локализация свидетельствуют в пользу того, что глутаматсвязывающие участки соответствуют физиологическим рецепторам глутамата именно в нейронах.

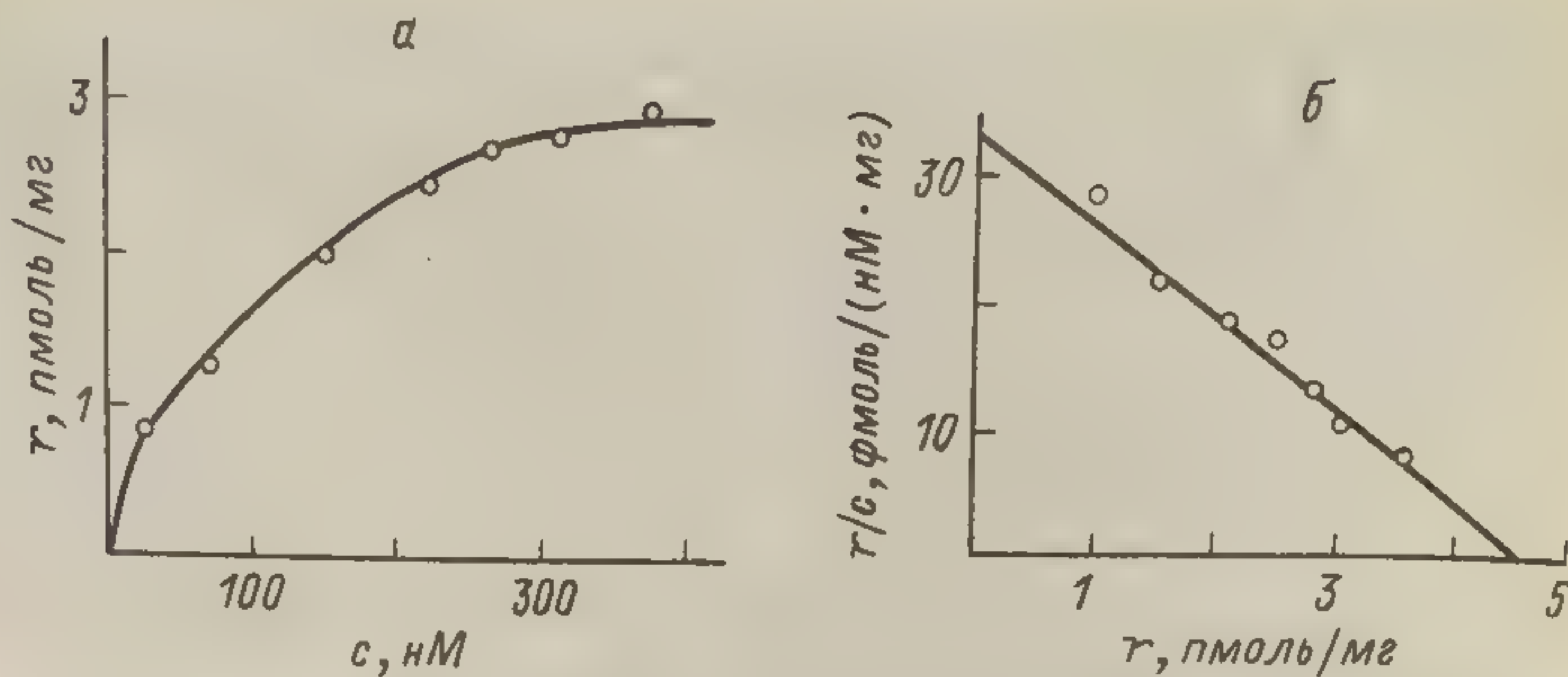


Рис. 5. Кинетика специфического связывания L - 3H -глутамата с синаптическими мембранами, изолированными из коры больших полушарий головного мозга крыс.

а — зависимость специфического связывания L - 3H -глутамата от концентрации метки в инкубационной среде: по оси абсцисс — концентрация (c) свободного лиганда (нМ); по оси ординат — специфическое связывание (r); б — представление экспериментальных данных в координатах Скэтчарда: по оси абсцисс — концентрация комплекса лиганд/рецептор (фмоль/(нМ · мг)), по оси ординат — отношение концентрации связавшегося комплекса к концентрации свободного лиганда (пМ/мг).

В наших исследованиях (Дамбинова, Городинский, 1984) было показано, что зависимость специфического связывания L - 3H -глутамата от концентрации носила насыщающий характер (рис. 5, а). Представление экспериментальных данных в координатах Скэтчарда (Scatchard, 1949) (рис. 5, б) свидетельствовало о наличии однородной популяции участков связывания с K_d около 180—200 нМ и $V_{\text{макс.}}$ 2.5—4.5 пмоль/мг белка.

Как уже указывалось, литературные данные о численных значениях специфического связывания L - 3H -глутамата значительно расходятся. Для коры головного мозга крыс приводятся следующие данные: $K_d = 600$ —800 нМ и $V_{\text{макс.}} = 75$ пмоль/мг белка (Foster, Fagg, 1978) и K_d 750 нМ и $V_{\text{макс.}} = 6.5$ пмоль/мг белка (Baudry, Lynch, 1981). В этих работах авторы использовали для суспензирования СМ ультразвуковую обработку, которая существенно влияет на состояние мембраны и параметры связывания глутамата. В другом исследовании (Viziere et al., 1980) описаны два типа участков связывания L - 3H -глутамата со значениями K_d 11 и 80 нМ. Поскольку эксперименты проводили на тотальной фракции мембран гомогената мозга крыс, то данные, полученные в этих опытах, требуют уточнения. В работе Михаелиса и соавт. (Michaelis et al., 1981), где предполагали наличие двух участков Na -независимого специфического связывания глутамата с K_d 60 и 260 нМ, вычисление кинетических значений проводили с использованием координат Лайнувера—Бэрга. Считается, что применение этих координат для описания нелинейной кинетики связывания является неправомерным, в этих случаях используют графики Скэтчарда (Варфоломеев, Зайцев, 1985).

Сравнение влияния ионов Na^+ на связывание L - 3H -глутамата с митохондриальными мембранами и СМ показало, что Na -зависи-

мое связывание характерно только для СМ и отсутствовало в мембранах митохондрий (Городинский, 1985). Следовательно, Na-зависимое связывание может быть использовано в качестве дополнительного маркера плазматических (синаптических) мембран. Остальные катионы в концентрации 5—25 мМ увеличивали связывание L-³H-глутамата (рис. 6, а, б). Результаты этих экспериментов в целом совпадают с аналогичными данными, полученными Бодри и Линчем (Baudry, Lynch, 1979). Полученные нами данные свидетельствуют о том, что СМ, выделенные из коры головного мозга крыс, были обогащены двумя различными типами участков связывания глутамата: Na-независимым с $K_d=180-200$ нМ и $V_{\text{макс.}} 2.5-4.5$ пмоль/мг белка и Na-зависимыми (поглощающими) участками с $K_d 650-700$ нМ и $V_{\text{макс.}} 60-80$ пмоль/мг белка (Дамбинова, Городинский, 1984).

Для выяснения природы ингибирующего действия Na^+ мы определили его влияние на процесс диссоциации связанного с мембранами глутамата. Диссоциация связанного L-³H-глутамата в присутствии Na^+ (150 мМ) значительно ускорялась. Константы скорости диссоциации, определенные в присутствии и отсутствии Na^+ , составляли соответственно 0.51 и 0.064 мин⁻¹.

Результаты экспериментов по исследованию диссоциации комплекса рецептор—нейромедиатор позволили А. И. Городинскому (1985) предположить, что подавление наблюдаемого специфического связывания L-³H-глутамата ионами Na^+ в физиологической

Таблица 2

Характеристика участков Na^+ -независимого связывания L-глутамата на синаптических мембранах разных структур мозга (Foster, Fagg, 1984)

Структуры мозга (виды животных)	K_d , нМ	$V_{\text{макс.}}$ пмоль/мг белка	Литература
Кора больших полушарий, крыса	830	28.0	Roberts, 1974
	210	3.0	Sanderson, Murphy, 1980
	363	13.1	Iwata et al., 1982
	370	6.2	Sanderson, Murphy, 1982
Передний мозг, крыса	834	61.6	Foster et al., 1981
	453	90.7	Foster et al., 1981
	60—70	70—135	Michaelis et al., 1981
	507	6.99	Fagg et al., 1983
	11	0.12	Biziere et al., 1980
Гиппокамп, крыса	770	6.50	Baudry, Lynch, 1981a
	110	14.00	Vargas, Costa, 1981
	11	2.50	Werling, Nadler, 1982
	190	20.00	Werling et al., 1983
	744	73	Foster, Roberts, 1978
Мозжечок, крыса	220	10	De Barry et al., 1980, 1983
	509	13	Honore et al., 1981
	604	21	Slevin et al., 1982
	3460	336.2	Vincent, Mc Geer, 1980
Полосатое тело, крыса	330	15	Head et al., 1980
Мозжечок, кошка	485	3.8	Brennan et al., 1981
Мозг, летучая мышь	270	11.9	Slevin et al., 1982

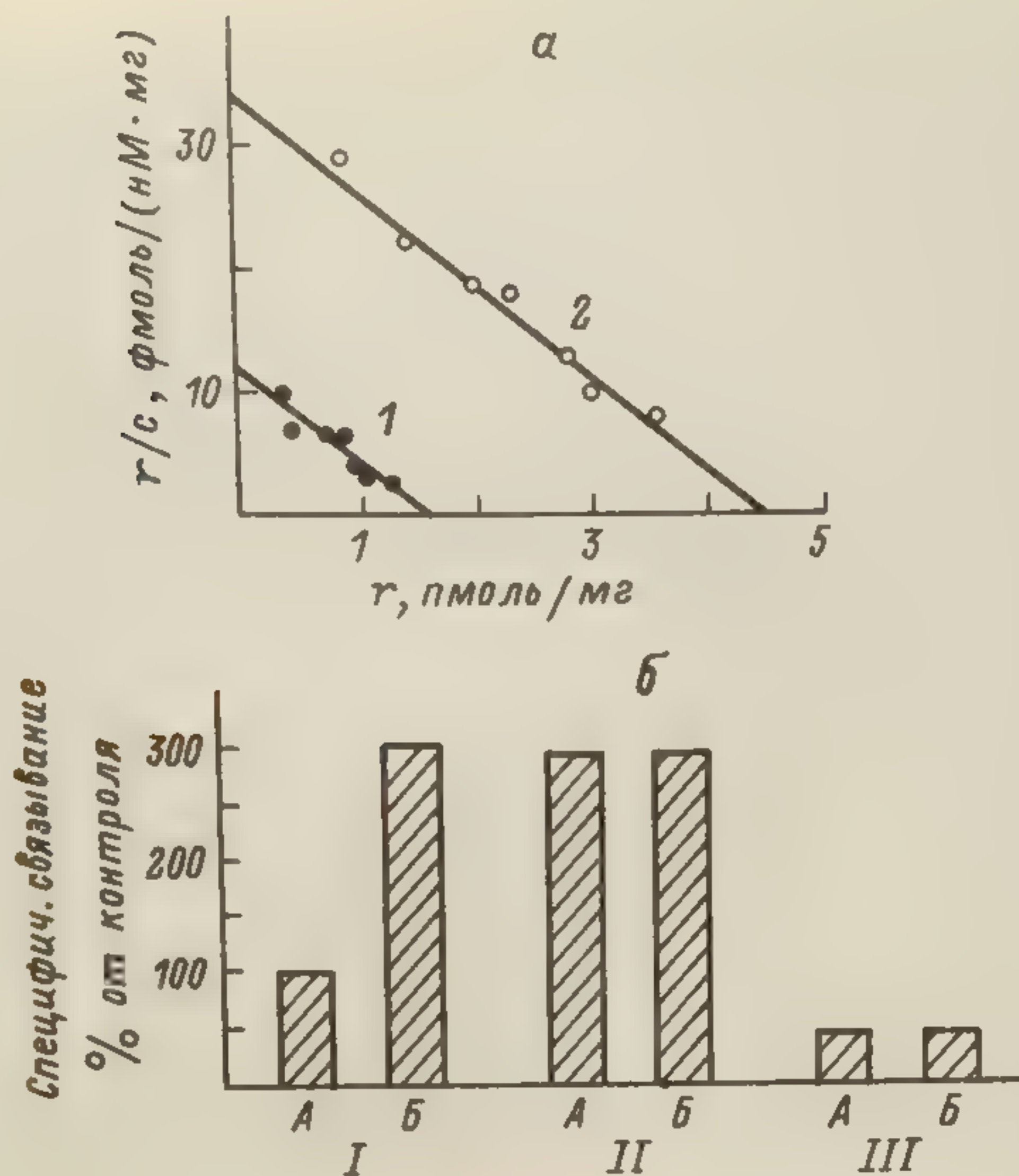


Рис. 7.

а — специфическое связывание L-³H-глутамата (данные представлены в координатах Скэтчарда) с синаптическими мембранами (I) и с синаптическими мембранами в присутствии 5 мМ Ca²⁺ в инкубационной среде (2); б — влияние ионов Ca²⁺ на специфическое связывание L-³H-глутамата со свежевыделенными синаптическими мембранами (I), с предварительно замороженными синаптическими мембранами (II), с мембранами митохондриальной фракции; ■ отсутствие Ca²⁺ (А) и в присутствии 5 мМ Ca²⁺ (Б) в инкубационной среде (III).

судается с имеющимися литературными данными. В работе Фагга и соавт. (Fagg et al., 1983) при замораживании синаптических мембран уровень связывания L-³H-глутамата снижался и исчезала зависимость связывания от ионов Ca²⁺. В отличие от упоминаемой работы, по нашим данным, процедура замораживания-оттаивания стимулировала специфическое связывание. Этот факт может свидетельствовать об эквивалентности активирующего действия замораживания-оттаивания и ионов Ca²⁺ на свежевыделенные синаптические мембраны.

На плазматических мембранах гибридных клеток нейробластомы 78—45×8 мы обнаружили участки связывания L-³H-глутамата, обладающие такими же свойствами, как и на синаптических мембранах, выделенных из мозга: сродством к лиганду (K_d около 190 нМ), активацией связывания глутамата в присутствии Ca²⁺ и подавлением связывания лиганда в присутствии Na⁺ (рис. 8, а, б). Отметим, что концентрация обнаруженных участков связывания в мембранах клеток нейробластомы была существенно

большой, чем на синаптических мембранах ($B_{\text{макс.}}$ около 40 пмоль/мг белка).

Наблюдаемое на свежесыведенных плазматических мембранах клеток нейробластомы подавление связывания $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата ионами Na^+ свидетельствует об отсутствии Na -зависимых участков связывания (и ассоциированной с ними системы активного транспорта медиатора) на мембранах гибридных клеток.

В табл. 3 суммированы полученные нами данные по связыванию $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата с мембранами различных типов. Сходство характеристик связывания с плазматическими мембранами нейробластомы и Na -независимого связывания с синаптическими мембранами мозга человека и крысы свидетельствует о возможном наличии глутаматных рецепторов в клетках нейробластомы. Вместе с тем видны значительные различия между характеристиками рецепторного связывания с СМ, с одной стороны, и связывания с мембранами митохондриальной фракции — с другой. Следует подчеркнуть, что совпадение значений K_d для этих типов участков связывания затрудняет их селективное изучение при одновременном наличии СМ и митохондрий в инкубационной смеси. Поэтому необходима тщательная очистка синаптических мембран от возможных примесей митохондрий.

Наличие примесей митохондриальных мембран в исследуемых фракциях может привести к ошибочным заключениям. В частности, $\text{Cl}^-/\text{Ca}^{2+}$ -независимые участки связывания, обнаруживаемые в грубой фракции синаптических мембран, выделенных из клеток спинного мозга (Meyna et al., 1982), по характеристикам совпадают с найденными нами на очищенных мито-

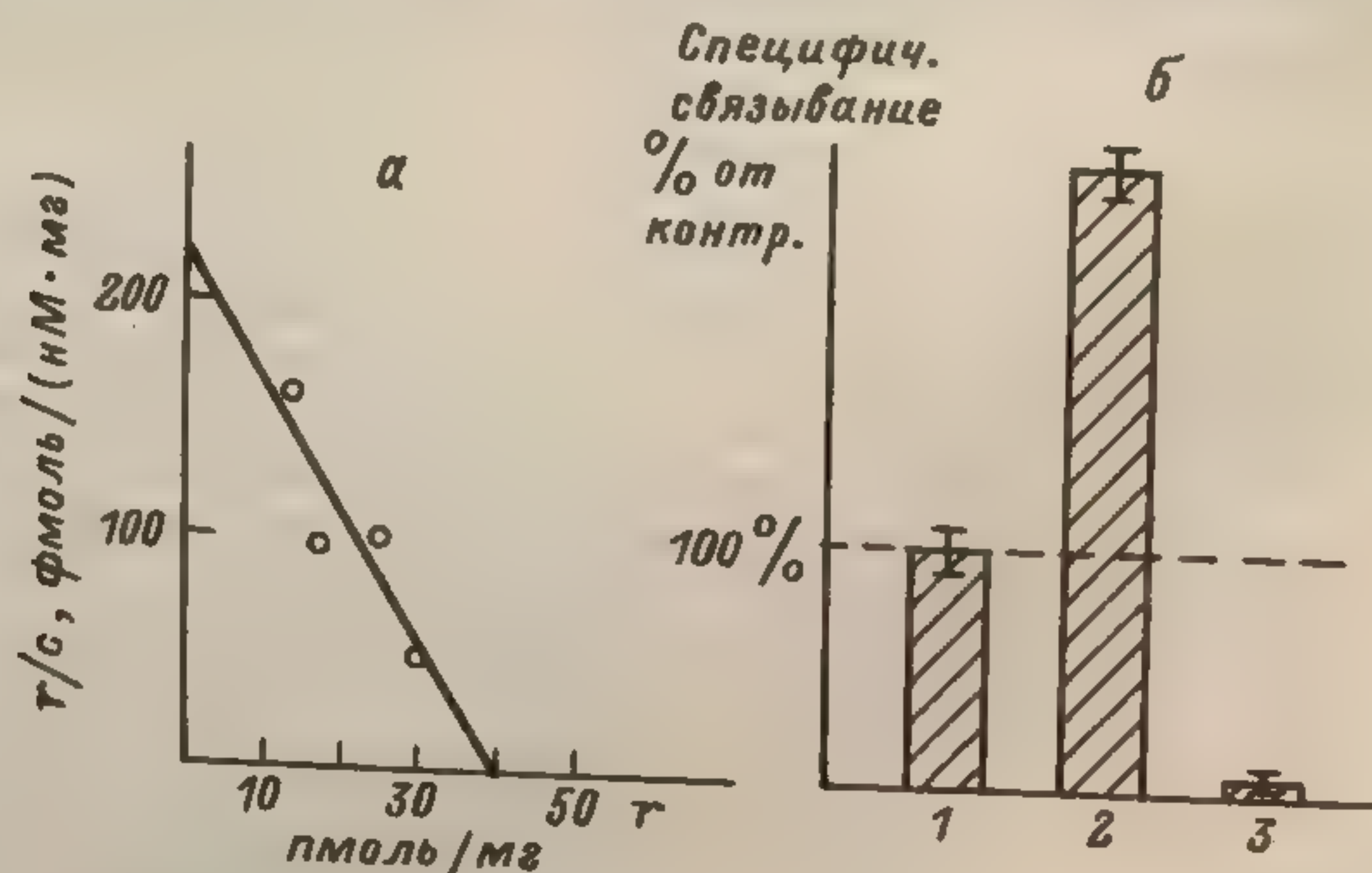


Рис. 8. Специфическое связывание $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата с плазматическими мембранами гибридных клеток нейробластомы 78=48X8.

а — представление данных в координатах Скэтчарда; б — влияние ионов на специфическое связывание, 1 — контроль, 2 — Ca^{2+} (5 М), 3 — Na^+ (150 мМ) в инкубационной среде.

Таблица 3

Характеристики специфического связывания L-³H-глутамата с различными мембранными фракциями

Вид мембран	K_d , мкМ	V_{\max} , пмоль/мг	Влияние Ca^{2+}	Влияние Na^+
СМ из коры головного мозга крыс, Na^+ -независимое связывание	180	4.5	Активирует	Подавляет
СМ из посмертных препаратов коры головного мозга человека	196	1.2	Активирует	Подавляет
Плазматические мембраны клеток нейробластомы 78—45Х8	180	40.0	Активирует	Подавляет
СМ из коры головного мозга крыс, Na^+ -зависимое связывание	2000	50.0	Не влияет	Активирует
Мембраны митохондриальной фракции	170	1.4	Не влияет	Не влияет
Плазматические мембраны клеток глии	1800	40.0	Не влияет	Активирует
Плазматические мембраны нейронов	250	5.8	Активирует	Подавляет
Плазматические мембраны клеток печени	2800	54.0	Не влияет	Не влияет
Плазматические мембраны клеток сердца	1500	35.0	Не влияет	Не влияет

хондриальных мембранах и, возможно, не имеют отношения к синаптическим рецепторам (Rin et al., 1984). Обращает на себя внимание факт существенного отличия кинетических параметров связывания L-³H-глутамата с мембранами клеток других органов (печени и сердца). Это свидетельствует о том, что связывающие участки принадлежат преимущественно транспортным системам на мембране.

Таким образом, можно заключить, что Na^+ -независимые участки рецепторного связывания L-³H-глутамата могут быть отнесены к физиологическим глутаматным рецепторам. В пользу этого свидетельствует ряд данных: сродство высокоаффинных участков связывания нейромедиатора находилось в пределах физиологических концентраций L-глутамата, действовавших на нейроны головного мозга, насыщаемость и обратимость связывания L-глутамата были сходными с аналогичными свойствами физиологического рецептора; рецепторное связывание L-³H-глутамата, которое соответствовало бы своими параметрами СМ, отсутствовало на мембранах глиальных клеток и внутриклеточных мембранах нейронов (McLennan, 1983).

2.3. Взаимодействие структурных аналогов глутамата с синаптическими мембранами

Классический подход к изучению структуры активного центра рецепторных молекул включает анализ функции «узнавания» нейромедиатора путем накопления сведений о характере ответа клетки на действие химических соединений определенного строения. Совокупность полученных данных дает возможность представить структуру субстратной площадки активного центра рецептора с целью избирательного поиска веществ с нужным фармакологическим действием (Михельсон, 1977).

К агонистам глутамата относятся вещества, способные вызывать возбуждающее действие на нейроны при аппликации их на плазматическую мембрану клетки. Большинство исследованных соединений являлось структурными аналогами молекулы глутамата, которую модифицировали различными химическими группами (Пиотровский, 1987). Подобные соединения сохраняли ту же стереоспецифичность действия, как и сам нейромедиатор, причем активность L-форм была много выше, чем у D-изомеров (Curtis, Watkins, 1960).

Уменьшение углеродной цепи молекулы глутамата на 1, 2 или 3 углеродных атома или его химическая модификация резко снижали возбуждающее действие веществ. Так, метилирование α -углеродного атома не изменяло активности медиатора, в то время как метилирование β -углеродного атома значительно снижало возбуждающий эффект; введение фенильной и гидроксильной группы в β -положение приводило к подавлению активности производного глутамата почти в тысячу раз (Davis, Watkins, 1979). Структурный аналог глутамата — ГАМК, представляющий собой продукт его декарбоксилирования, не оказывал какого-либо действия на глутаматные рецепторы. То же самое наблюдали для глутамина.

На основании этих исследований Кертис и Уоткинс (Curtis, Watkins, 1960) предположили, что активный центр рецепторной молекулы должен содержать две положительно заряженные группы, способные узнавать α - и γ -карбоксигруппы глутамата и α - и β -карбоксигруппы аспартата. Третьим участком узнавания рецепторного белка, по-видимому, является отрицательно заряженная группа, специфически взаимодействующая с аминогруппой нейромедиатора.

Это положение хорошо иллюстрируется фактами, приведенными в табл. 4 (цит. по: Foster, Fagg, 1984). В таблице представлены результаты определения относительной вытесняющей активности кислых дикарбоновых аминокислот и их структурных аналогов по отношению к связыванию синаптическими мембранами L-³H-глутамата. Видно, что наибольшей вытесняющей способностью характеризуются аналоги глутамата, обладающие сильным возбуждающим действием: квисквалат и иботенат, а также α -сульфоновые аминокислоты — L-серин-о-сульфат, L-гомоцисте-

Таблица 4

Вытеснение L-³H-глутамата с участков связывания на синаптических мембранах (Foster, Fagg, 1984)

Аналоги L-глутамата	Значения K _n				Значения IC ₅₀ , мкМ				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
L-глутамат	2.3	0.8	0.4	1.2	0.21	1.2	0.45	—	—
D-глутамат	13.9	10.0	9.0	9.3	2.6	180.0	—	—	—
L-аспартат	20.3	6.0	11.0	10.4	2.1	56.0	—	—	4.4
D-аспартат	66.5	50.0	27.0	23.0	7.6	250.0	—	—	—
D,L-α-аминоадипат	12.7	1.3	—	—	—	—	—	—	—
L-α-аминоадипат	—	—	—	0.5	0.21	—	—	—	—
D-α-аминоадипат	—	—	1.2	1.0	0.7	—	—	—	—
D,L-гомоцистеинат	5.2	1.6	—	—	—	—	—	—	—
L-гомоцистеинат	—	—	0.4	—	0.26	0.7	—	—	—
D-гомоцистеинат	—	—	—	—	0.5	3.2	—	—	—
L-цистеинат	—	—	—	—	—	24.0	—	—	—
D-S-сульфоцистеин	—	—	—	—	—	0.5	—	—	—
D-S-сульфоцистеин	—	—	—	—	—	1.0	—	—	—
L-серин-о-сульфат	—	—	0.053	—	—	—	—	—	—
D,L-APP	—	—	1000	—	500	—	—	—	—
D,L-APB	—	—	5.0	—	—	—	—	—	—
L-APB	12.3	4.2	4.5	1.1	1.2	—	—	—	—
D-APB	—	—	75.0	—	—	—	—	—	—
D,L-APV	—	—	39.0	—	4.4	—	—	—	—
L-APV	—	—	—	6.6	—	—	—	—	—

Таблица 4 (продолжение)

Аналоги L-глутамата	Значения K_i				Значения IC_{50} , мкМ				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
D-APV	—	—	—	5.9	—	—	—	—	—
D,L-APHX	—	—	5.0	100	—	—	—	—	—
D,L-серин-о-фосфат	—	—	92.0	—	—	—	—	—	—
L,L-серин-о-фосфат	—	—	303.0	—	—	—	—	—	—
D,L-квисквалат	4.0	0.2	0.1	0.4	0.24	0.5	—	—	0.65
D,L-иботенат	3.9	1.2	0.5	0.8	0.4	—	80	—	—
D,L-AMPA	—	—	—	—	28.0	—	350	—	—
АДСР цис-, транс-	—	—	—	1.7	—	—	—	—	—
Хинолинат	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Каинат	—	—	—	—	500	—	—	1000	—
D-γ-глутамилглицин	1000	1000	100	100	—	1000	—	—	100
GD EE	—	—	—	100	120	—	—	—	—
NMA	1000	1000	—	100	210	—	—	—	—
N-Ac-Asp-Glu	1000	1000	1000	—	—	—	—	—	—
N-Ac-Glu-Asp	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Asp-Glu	—	—	—	—	—	—	—	—	0.31
Glu-Asp	—	—	—	—	—	—	—	—	100
Глутатион (восст.)	—	—	—	—	—	—	—	—	1.1
	—	—	—	—	—	—	—	—	100
	—	—	—	—	—	—	—	—	2.1

Примечание. Влияние различных веществ на специфическое связывание определяют, добавляя их в инкубационную среду в известной концентрации. Значение константы ингибирования K_i рассчитывают по формуле (Foster, Fagg, 1984): $K_i = IC_{50}(1 + C/K_D)$, где IC_{50} — концентрация исследуемого вещества, при которой достигается 50 % ингибирование; C — концентрация метки в пробе; K_D — константа диссоциации связавшейся метки. 1 — Foster, Roberts, 1978; 2 — Baudry, Lynch, 1981; 3 — Fagg et al., 1983; 4 — Slevin et al., 1982; 5 — Werling et al., 1983; 6 — Mewett et al., 1983; 7 — Honore et al., 1981; 8 — Honore et al., 1985; 9 — Koller, Coyle, 1984.

инат и α -сульфо-L-цистеинат. Следует отметить, что далеко не все агонисты, выявленные с помощью электрофизиологических экспериментов, активно конкурируют с L-глутаматом за участки специфического связывания на мембране нейронов. Например, N-метил-D-аспартат, каиновая кислота и α -амино-3-окси-5-метил-4-изоксазол-пропионат практически не влияли на связывание радиоактивного глутамата. Возможно, что эти агонисты действуют не на активность самих рецепторных узнающих участков, а на другие стадии синаптического процесса. Например, для каиновой кислоты было показано, что она в большей степени является конкурентным ингибитором высокоаффинного поглощения L-глутамата (Johnston et al., 1979).

Как видно из табл. 4, можно выделить три основные группы агонистов глутамата в разных конформационных состояниях: «растянутой», «слегка сжатой» и «сжатой». Эти конформации отличаются друг от друга расстояниями между карбоксильными группами и между атомом азота аминогруппы и ϵ -карбоксильным атомом углерода (Johnston et al., 1974). Предполагают, что «растянутая» конформация молекулы агониста (например, квискавалиновая кислота) способна взаимодействовать с большинством подтипов глутаматных рецепторов, в том числе и аспартатных рецепторов. Вместе с тем «слегка сжатая» и «сжатая» форма агонистов (иботеновая, каиновая кислоты) проявляют избирательные свойства и обладают более мощным возбуждающим эффектом. Активность этих «ригидных» аналогов может быть объяснена «трехточечной» схемой взаимодействия с активным центром глутаматного рецептора, так как в структуре гетероциклического ядра имеется «кислый» атом кислорода, который несет отрицательный заряд, соответствующий локализации ϵ -карбоксильного атома кислорода в молекуле глутамата.

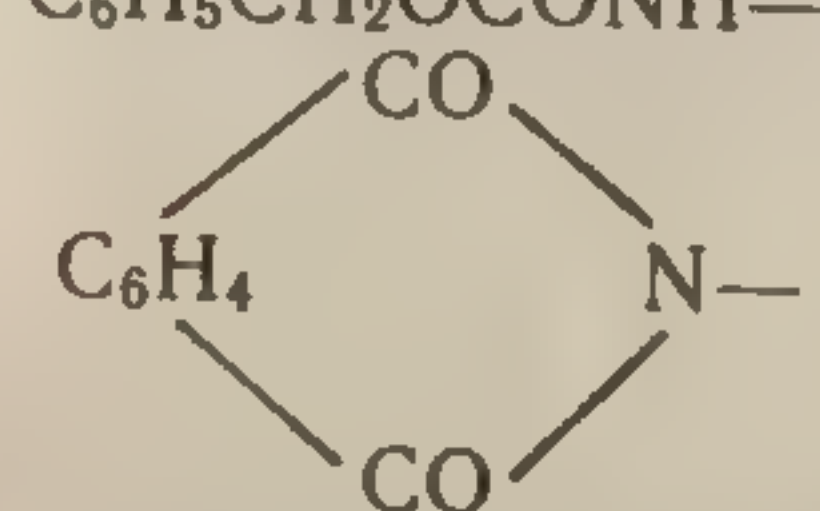
С веществами, способными селективно подавлять возбуждающее действие глутамата — антагонистами, дело обстоит много сложнее (Пиотровский, 1987). Высказывается предположение (Fagg et al., 1982), что основной причиной различия между агонистами и антагонистами является величина заряда на ϵ -карбоксильной группе при физиологических значениях pH.

Как представлено в табл. 4, среди антагонистов глутаматных рецепторов наибольшей активностью обладают 2-амино-4-фосфономасляная (APB), 2-амино-6-фосфоногептановая кислота и α -L-аминоадипиновая кислота (Foster, Fagg, 1984). Обнаружено, что действие γ -L-глутамилглицина проявляется лишь в высоких концентрациях. Диэтиловый эфир глутаминовой кислоты вообще не оказывает влияния на связывание радиоактивного глутамата с синаптическими мембранами головного мозга млекопитающих. Следовательно, в молекуле глутамата важную роль играют именно концевые карбоксилы (Кудряшова и др., 1987).

Из результатов, полученных Пиотровским и др. (1986) (табл. 5), видно, какими основными группировками формируется «силовое поле» активного центра глутаматных рецепторов голов-

Таблица 5

Влияние производных дикарбоновых аминокислот на специфическое связывание L-³H-глутамата с синаптическими мембранами коры головного мозга крыс (Пиотровский и др., 1986)

Номер соединения	$\begin{array}{c} R^1 - (CH_2)_n - CH - R^2 \\ \\ R^3 \end{array}$					эффективность (K _i , мкМ)
	R ¹	R ²	R ³	n	ОА *	
I	HOOC—	HOOC—	NH ₂ —	2	L	0.35
II	HOOC—	HOOC—	NH ₂ —	1	L	1.5
III	NH—	HOOC—	NH ₂ —	2	—	Не эффективно
IV	HOOC—	NH—	NH ₂ —	2	—	»
V	HOOC—	HOOC—	NH—	2	—	»
VI	C ₂ H ₅ OOC—	C ₂ H ₅ OOC—	NH ₂ —	2	L	»
VII	NH ₂ NCO—	HOOC—	NH ₂ —	2	L	6.0
VIII	HOOC—	NH ₂ CO—	NH ₂ —	2	L	Не эффективно
IX	C ₂ H ₅ CH ₂ OCO—	HOOC—	NH ₂ —	2	L	9.1
X	HOOC—	C ₂ H ₅ CH ₂ OCO—	NH ₂ —	2	L	1.8
XI	HOOC—	HOOC—	C ₆ H ₅ CONH—	2	L	Не эффективно
XII	HOOC—	HOOC—	C ₆ H ₅ CONH—	1	L	35.0
XIII	HOOC—	HOOC—	C ₆ H ₅ CH ₂ CONH—	2	L	57.0
XIV	HOOC—	HOOC—	C ₆ H ₅ CH ₂ CONH—	1	L	11.0
XV	HOOC—	HOOC—	C ₆ H ₅ CH ₂ OCONH—	2	L	37.0
XVI	HOOC—	HOOC—	C ₆ H ₅ CH ₂ OCONH—	1	L	65.0
XVII	HOOC—	HOOC—		2	L	28.0
XVIII	HOOC—	HOOC—	2—COOH—C ₆ H ₄ CONH—	2	L	96.0
XIX	HOOC—	HOOC—	CH ₃ (CH ₂) ₈ CONH—	2	D,L	Не эффективно
XX	HOOC—	HOOC—	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CONH—	2	D,L	30.0
XXI	HOOC—	HOOC—	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CONH—	2	D,L	28.0

* ОА — оптическая активность.

ного мозга. Обнаружено, что известная схема, согласно которой считается, что активный центр макромолекулы рецептора содержит три участка связывания лиганда (Curtis, Watkins, 1960), успешно применима лишь к некоторым соединениям. В частности, легко объяснима на основании этой гипотезы неэффективность соединений III—IV, лишенных одной из ионных групп (α - и γ -аминомасляные кислоты), а также V (глутаровая кислота). Одновременное блокирование двух любых групп в молекуле аналога глутамата, как в случае диэтилового эфира глутаминовой кислоты (VI), приводит к полному соответствию с данной гипотезой к инактивации соединения.

С другой стороны, анализ полученных результатов для большинства исследованных соединений выявил следующую закономерность: изменение ионного заряда только одной из групп приводит к соединениям, сохраняющим способность к ингибированию специфического связывания. Так, α - и γ -бензиловые эфиры L-глутаминовой кислоты (IX и X) и глутамин (VII) проявляли достаточно высокую ингибирующую активность. Пока неясной в этом ряду представляется неэффективность L-изоглутамин (VIII). Ингибирующие свойства проявляли, хотя и в меньшей степени, N-ацилпроизводные глутаминовой и аспарагиновой кислот (XII—XVIII и XX, XXI). В соответствии с этим активность арильных и арилкильных производных по-видимому, зависит от липофильности заместителей. Сохраняется ингибирующая активность и при превращении аминного азота не только в амидный, но и в имидный (фталил-L-глутаминовая кислота, VII).

На основании полученных данных кажется очевидным, что для специфического связывания производных аминокислот с активным центром рецептора достаточно наличия в молекуле лиганда только двух ионогенных групп: либо двух анионных, либо одной анионной и одной катионной. Способность к образованию ионной связи третьей функциональной группой не имеет, по-видимому, существенного значения, так как она может быть лишена этой способности без значительного ущерба для активности соединения. Возможно, что при двухучастковой схеме связывания в третьем участке может осуществляться за счет других полярных взаимодействий, например образования водородной связи. Весьма вероятно, что определенную роль в связывании химических соединений играют гидрофобные связи липофильных радикалов лиганда с гидрофобным окружением узнающего участка глутаматного рецептора (Пиотровский и др., 1986).

Подтверждением этой гипотезы служат также данные, приведенные ниже и касающиеся ингибирующих свойств малых глутаматсодержащих пептидов, влияющих на сродство L-³H-глутамата к рецепторам синаптических мембран головного мозга крыс.

Существование эндогенных веществ, ингибирующих рецепторное связывание нейромедиаторов мозга *in vitro*, представляет значительный интерес в связи с тем, что эти вещества могут претендовать на роль как истинных лигандов, так и модуляторов

синаптической передачи (Snyder, 1983). В настоящее время в литературе имеются сообщения об идентификации эндогенных ингибиторов рецепторов ГАМК (Toffano et al., 1978), бензодиазепинов (Davies, Cohen, 1980) и ацетилхолина (Quik, 1982; Sershen et al., 1984).

Предположение о наличии эндогенного ингибитора рецепторного связывания L-глутамата было впервые сделано Шариф и Робертсом (Sharif, Roberts, 1980b) в связи с установлением факта возрастания специфического связывания ^3H -глутамата при последовательной отмывке выделяемых из мозга синаптических мембран. Из мозга крыс выделен дипептид N-ацетиласпартил-глутамат, ингибировавший связывание L- ^3H -глутамата с синаптическими мембранами (Zaczek et al., 1983). По предположению авторов выделенный дипептид может выполнять функцию нейромедиатора в синапсах, ранее квалифицированных как глутамат- или аспартатергические.

Нами были также найдены эндогенные пептиды, ингибирующие связывание L- ^3H -глутамата с синаптическими мембранами, функция которых пока не изучена (Городинский, Дамбинова, 1986).

Поскольку изучение физико-химических свойств и первичной структуры выделенных нами пептидов представляет собой непростую задачу, то казалось целесообразным попытаться проанализировать влияние синтезированных пептидов, содержащих глутаминовую кислоту и сдвоенные производные глутамата, на рецепторное связывание L- ^3H глутамата и на функцию глутаматных рецепторов.

В табл. 6 представлены результаты исследования влияния синтезированных глутаматсодержащих дипептидов и пептидов, имеющих на С-конце пироглутамат, на рецепторное связывание L- ^3H -глутамата. Кроме того, нами были исследованы некоторые известные эндогенные пептиды опиоидного ряда (мет-энкефалин, лей-энкефалин, β -эндорфин).

Как видно из табл. 6, наибольшей активностью обладал N-ацетилглицилглутамат ($K_i = 4.8$ мкМ). Сродство рецепторов к остальным пептидам, в том числе и к ближайшему аналогу — N-ацетилглициласпартату, — было как минимум на порядок ниже. Действие пептидов, имеющих на С-конце молекулы пироглутаминовую кислоту, влияло крайне незначительно и в концентрации 100 мкМ не превышало 20 % ингибирования. Такой же эффект наблюдали и у коротких опиоидных пептидов, в то время как β -эндорфин M_r 3500 практически не изменял рецепторное связывание L- ^3H -глутамата.

Примечательно, что широко известная спаглутаминовая кислота (N-ацетиласпартилглутамат) в концентрации 100 мкМ не оказывала влияние на активность глутаматных рецепторов. Этот результат не подтвердил имеющиеся литературные данные (Zaczek et al., 1983), в которых этот пептид, выделенный из экстракта мозга, эффективно с большей активностью, чем сам нейромедиатор, вытеснял меченый глутамат с участков связыва-

Ингиб
рецепт

Номер
соеди
нения

I	
II	
III	
IV	A
V	A
VI	A
VII	pC
VIII	pC
IX	pC
X	Ty
XI	Ty
XII	β -э

ния. С другой с
согласуются с
опубликованной
получены ожида
связывали этот
имела место за
матом, содержа
результаты неда
показали, что д
повсеместным ин
тамата.

Таким образо
коротких пептидо
роли процессов, п
Для того чтобы со
на глутаматные ре
их активного цент
данных (Кудряшс
что наиболее эфф
соединения, содер
со свободными кар
В табл. 7 пре
производных глута
ряшовой. Как видн
ным ингибировать р

Таблица 6

Ингибирование глутаматсодержащими пептидами
рецепторного связывания L-³H-глутамата

Номер соединения	Химическая формула	Эффективность (K _i , мкМ)
	O-Bzl	
I	H-Glu-Asp-OH	70.0
II	Z-Ala-Glu-OH	58.0
III	Ac-Asp-OH	Не эффективно
	Glu-O-Et	
IV	Ac-Asp-Glu-OH	Не эффективно
V	Ac-Gly-Glu-OH	4.8
VI	Ac-Gly-Asp-OH	52.5
VII	pGlu-His-Pro-OMe	85.0
VIII	pGlu-His-Pro-NH ₂ (тиролиберин)	60.3
IX	pGlu-His-Tip-OMe (С-конец-люлиберина)	58.5
X	Tyr-Glu-Gly-Phe-Met-OH (мет-энкефалин)	Не эффективно
XI	Tyr-Glu-Gly-Phe-Leu-OH (лей-энкефалин)	Не эффективно
XII	β-эндорфин	Не эффективно

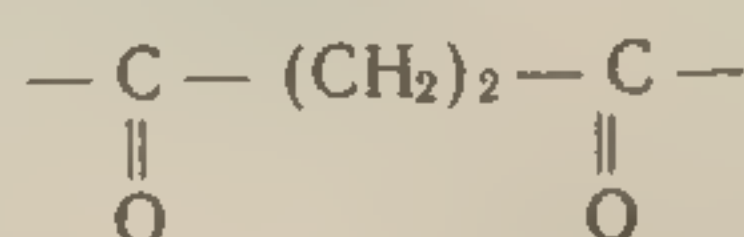
ния. С другой стороны, результаты наших исследований хорошо согласуются с данными, приведенными в сравнительно недавно опубликованной работе (Riveros et al., 1984), в которой не были получены ожидаемые эффекты спазмолитической кислоты. Авторы связывали этот факт с тем, что в указанных выше исследованиях имела место загрязненность фракции пептида эндогенным глутаматом, содержащимся в синапсах. С этими фактами согласуются результаты недавних исследований (Baud, Fagg, 1986), которые показали, что дипептиды, содержащие глутамат, не обладают повсеместным ингибирующим действием на связывание L-³H-глутамата.

Таким образом, оказалось, что простой скрининг известных коротких пептидов малоэффективен для изучения модуляторной роли процессов, происходящих в глутаматрецептивных синапсах. Для того чтобы создать соединения, направленно воздействующие на глутаматные рецепторы, необходимо было выяснить токсичность их активного центра. Анализ накопленных к настоящему моменту данных (Кудряшова и др., 1987) позволил нам предположить, что наиболее эффективными аналогами глутамата должны быть соединения, содержащие глутамат и обладающие структурой со свободными карбоксигруппами на концах молекулы.

В табл. 7 представлены структурные формулы сдвоенных производных глутаминовой кислоты, синтезированных Н. И. Кудряшовой. Как видно, наиболее эффективным соединением, способным ингибировать рецепторное связывание L-³H-глутамата, оказа-

лось соединение, в котором между молекулами глутамата были углеводородные цепочки с длиной, соответствующей $n=2$. Активность этого сдвоенного производного более чем в 10 раз превышала действие остальных соединений. Вызывает также интерес высокая эффективность соединений, содержащих ароматические «мостики», которая возрастала по мере сближения остатков глутаминовой кислоты.

По результатам биохимического тестирования этих соединений можно предположить наличие в комплексе мембраносвязанного глутаматного рецептора как минимум двух идентичных участков связывания, удаленных друг от друга на расстояние, приблизительно соответствующее длине цепи:



Отметим, что в этих исследованиях четко проявилась стереоизбирательность L-изомера бис-глутамида янтарной кислоты (II) по сравнению с мезо-изомером (III) (табл. 7). По-видимому, это связано с наибольшей биологической комплементарностью активных групп лиганда с участками активного центра рецепторной молекулы. Такими активными группами в молекуле бис-глутамида янтарной кислоты могут оказаться карбоксильные группы.

В связи со сказанным представляло существенный интерес исследование физиологических эффектов этих производных глутамата *in vitro* (Маргулис и др., 1988). В качестве наиболее удобной модели для изучения функционирования глутаматных рецепторов

Таблица 7

Ингибирование сдвоенными производными глутаминовой кислоты рецепторного связывания $^3\text{H-L-}$ глутамата

Номер соединения	R	Эффективность (K_i , мкМ)
I	—CH ₂ —	78.0
II	—(CH ₂) ₂ —	3.5
III	—(CH ₂) ₂ — L-изомер	7.0
IV	—(CH ₂) ₄ —	70.0
V	—(CH ₂) ₆ —	42.0
VI	—(CH ₂) ₈ —	56.0
VII	<i>p</i> -C ₆ H ₅ —	Не эффективно
VIII	<i>m</i> -C ₆ H ₅ —	105.0
IX	<i>o</i> -C ₆ H ₅ —	30.0

Примечание. Все соединения, кроме III, представлены мезо-изомерами.

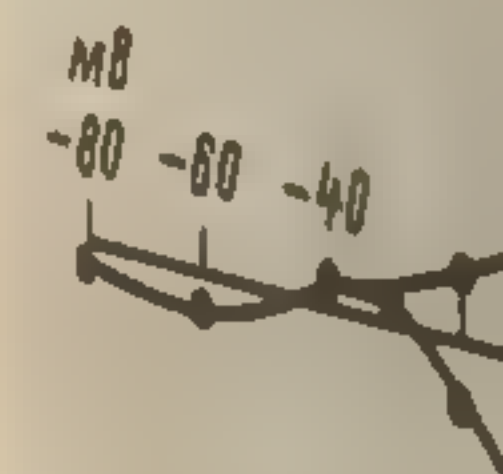
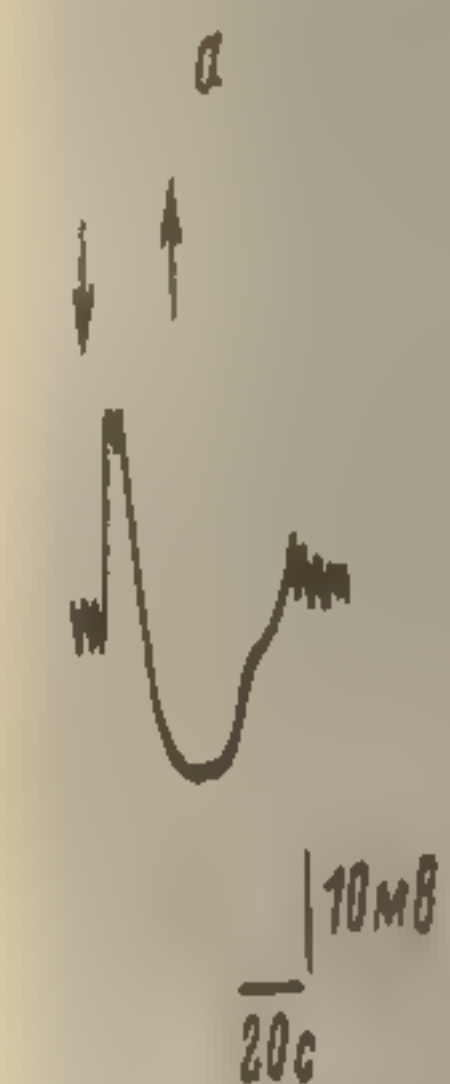


Рис. 9. Влияние (10^{-3} М) на физиологическую активность нейронов моллюска *Corneus*.

а — действие L-глутамата на величину трансмембранного потенциала нейрона в pedal ganglion; б — действие L-глутамата на величину трансмембранного потенциала нейрона в pedal ganglion; в — действие L-глутамата на величину трансмембранного потенциала нейрона в pedal ganglion; г — действие L-глутамата на величину трансмембранного потенциала нейрона в pedal ganglion.

были выбраны нейроны пресноводного моллюска роговой катушки, которые, как было ранее показано (Гапон, Самойлова, 1982), обладают высокой чувствительностью к L-глутамату.

М. Н. Маргулис и др. (1988) показали, что аппликация сдвоенных производных глутаминовой кислоты вызывала деполяризацию мембраны нейронов, отвечавших на глутамат, и не вызывала никакого ответа у нейронов, не имеющих глутаматных рецепторов.

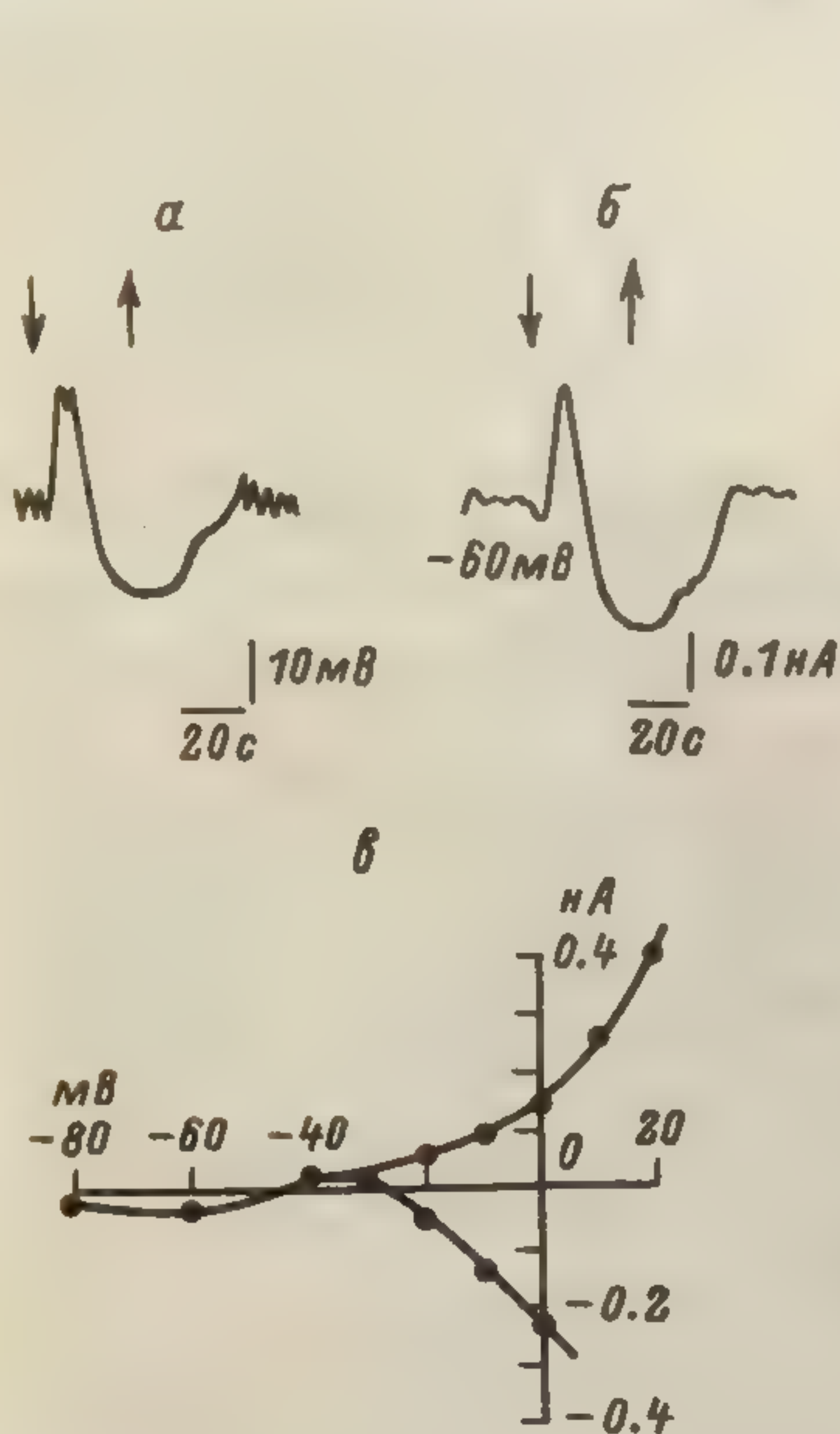


Рис. 9. Влияние L-глутамата (10^{-3} М) на физиологические ответы нейронов моллюска *Planorbarius corneus*.

■ — действие L-глутамата (стрелки) на величину трансмембранного потенциала нейрона в педальном ганглии; б — действие глутамата (стрелки) на фоне изменения трансмембранного тока; ■ — вольт-амперная характеристика мембраны изолированных нейронов при аппликации L-глутамата ■ инкубационную среду. По оси ординат — сила тока (нА); по оси абсцисс — напряжение (мВ).

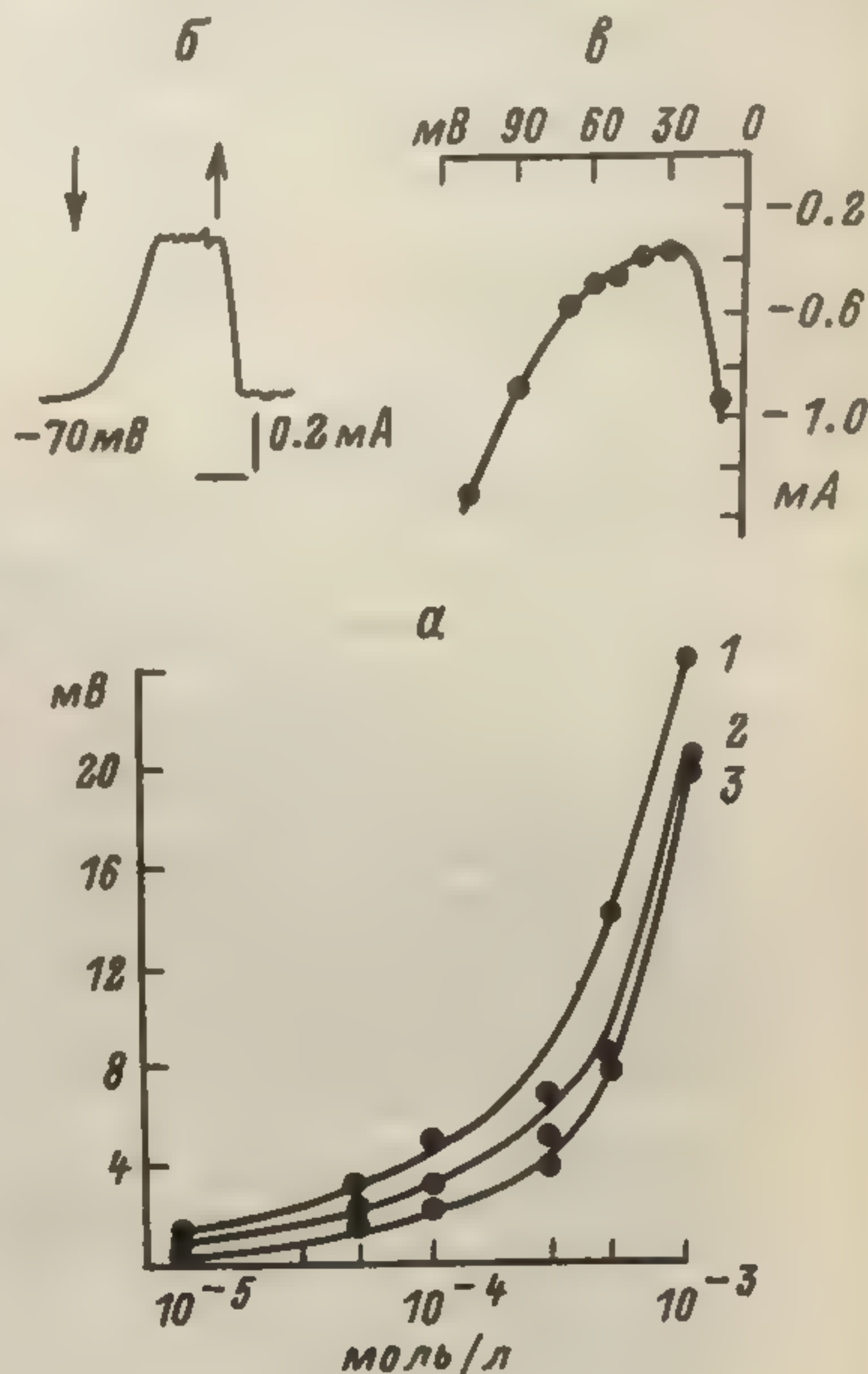


Рис. 10. Влияние сдвоенных производных глутаминовой кислоты на физиологические ответы нейронов моллюска *Planorbarius corneus*.

а — влияние некоторых производных с различной длиной цепи $=(CH_2)_n=$ на зависимый от дозы ответ нейрона (трансмембранный потенциал): 1 — $n=2$ (L-форма); 2 — $n=2$ (мезо-форма); 3 — $n=1$. По оси ординат — концентрация (моль); по оси абсцисс — напряжение (мВ). б, в — изменение трансмембранного тока и вольт-амперная характеристика мембраны нейрона при действии сдвоенного производного глутамата с $n=2$ (мезо-форма). (10^{-3} моль). Остальные обозначения, как на рис. 9, в.

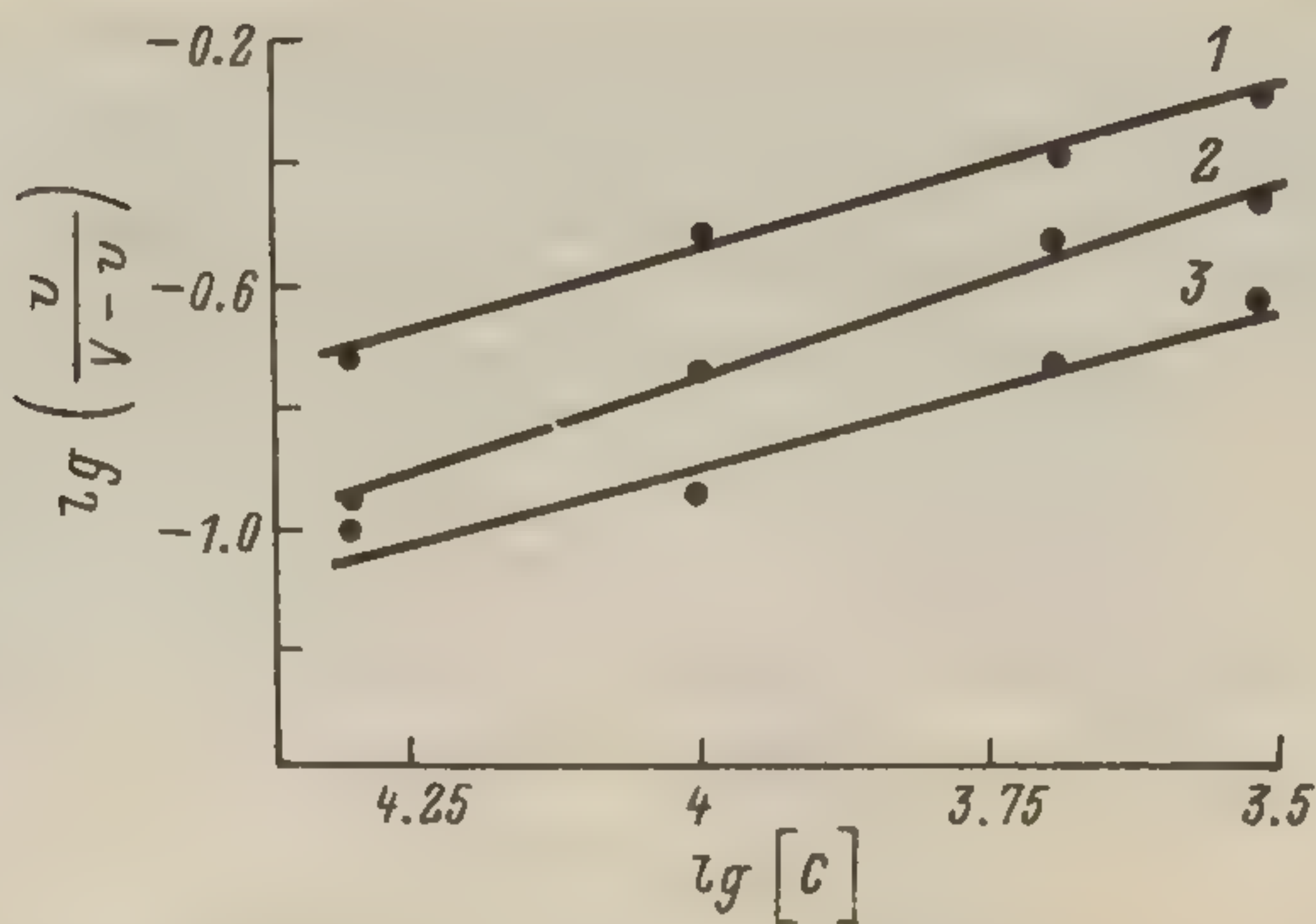


Рис. 11. Представление данных в координатах Хилла, рассчитанных для взаимодействия рецептора со сдвоенными производными L-глутамата.

1 — $n=2$ (L-форма); 2 — $n=2$ (мезо-форма); 3 — $n=1$. По оси абсцисс — логарифм концентрации веществ; по оси ординат — величина $\lg \frac{v}{V-v}$, где v — величина эффекта, V — максимальный эффект.

Различий в характере ответа на сдвоенные производные у выделенных нейронов и у нейронов ганглии не наблюдалось. На рис. 9 представлено дозо-зависимое действие для некоторых производных с различной цепочкой — $(\text{CH}_2)_n$ —, независимо от длины которой пороговые концентрации мало отличались между собой и были порядка 10^{-5} М. Наиболее выраженный эффект синтезированных соединений наблюдался при концентрациях 10^{-4} — 10^{-5} М.

При аппликации тестируемых соединений в условиях фиксации потенциала на мембране получены разные ответы (рис. 10, а) и вольт-амперные характеристики (рис. 10, в), вид которых позволяет предположить участие в ответе ионов Ca^{2+} .

График Хилла для глутамата и наиболее активных соединений представлен на рис. 11, из которого следует, что коэффициент, свидетельствующий о кооперативности, для глутамата равен двум.

Оценка эффективности сдвоенных производных глутамата в зависимости от дискретной величины n в цепочке — $(\text{CH}_2)_n$ — была произведена по относительным изменениям проводимости при аппликации соединений на одном и том же препарате в однотипных условиях наблюдения. Полученные величины сведены в табл. 8, из которой видно, что наиболее активными соединениями оказались вещества с $n=2$ и 8, в то время как сдвоенные производные с $n=1, 3$ и 6 были менее активны. Результаты опытов с соединением, у которого $n=2$ (бис-амид янтарной кислоты), демонстрирует четкую стереоспецифичность влияния на усиление ионной проводимости в зависимости от наличия мезо- или L-изомеров.

Экспериментальные данные по физиологическому действию сдвоенных производных глутаминовой кислоты на нейроны моллюска роговой катушки подтвердили ряд закономерностей, полу-

ченных нами ранее (Кудряшова и др., 1987). Так, для этих веществ были продемонстрированы конкурентные с L-³H-глутаматом взаимодействия за участки связывания на синаптических мембранах мозга крыс. Поскольку также сдвоенные производные оказались способными активировать D-рецепторы нейронов моллюска и усиливать проницаемость ионов через мембрану, то, вероятно, исследуемые соединения можно отнести к классу агонистов глутаматных рецепторов.

Предполагаемое наличие значительной химической комплементарности соединений к «узнающим» участкам макромолекулы глутаматного рецептора подтверждается и фактом стереоспецифичности влияния мезо- и L-форм (изомеров) глутамата, входящих в производные с длиной цепочки $n=2$. Ранее (Гапон, Самойлова, 1982) было отмечено, что на нейроне моллюска D-глутамат вызывал ответ в 2 раза слабее, чем L-изомер. Таким образом, можно предположить, что активирующее действие производных глутаминовой кислоты тем сильнее, чем выше вероятность взаимодействия сразу двух отрицательно заряженных групп остатков глутаминовой кислоты.

Линейное возрастание числа n , т. е. длины цепочки $-(CH_2)_n-$ в связующем звене сдвоенных производных, дает нелинейное изменение активности веществ с характерным чередованием в возрастании активности для четных n и уменьшении для нечетных. Эти данные перекликаются с фактами, установленными для никотиновых холинорецепторов, исследованных с помощью бис-аммониевых соединений (Скок, 1985). Таким образом, расстояние между анионными зарядами активных групп агонистов оказалось весьма существенным и, вероятно, указывает, что в топохимию активного центра одной макромолекулы глутаматного рецептора входят несколько глутаматсвязывающих участков, повторяющихся с определенными интервалами. Наши предварительные расчеты позволяют предположить их равными 8.0 нм.

2.4. Классификация глутаматных рецепторов

Согласно современным представлениям, большинство известных нейромедиаторов способно взаимодействовать более чем с одним классом рецепторных макромолекул. Фактически для

Т а б л и ц а 8

Относительная активность сдвоенных производных глутаминовой кислоты (Маргулис и др., 1987)

Величина цепи $-(CH_2)_n$	Величина активности
1	0.38 ± 0.03
2	0.64 ± 0.03
Мезо-форма 2	0.72 ± 0.10
L-форма 3	0.49 ± 0.10
4	0.42 ± 0.05
6	0.42 ± 0.05
8	1.00 ± 0.00

П р и м е ч а н и е. Величину активности рассчитывали по отношению к величине максимальной активности (принятой за единицу) сдвоенного производного L-глутамата с длиной цепи $n=8$.

всех основных типов медиаторов (ацетилхолина, катехоламинов, ГАМК и нейропептидов) признается наличие множественности структурных типов нейрорецепторов (Johnston, 1983). Не составляют исключения в этом плане и глутаматные рецепторы ЦНС. Сравнительно недавно это было подтверждено для рецепторного связывания глутамата. Предполагают, что множественность типов глутаматных рецепторов объясняется различием физиологического ответа клетки в ответ на аппликацию нейромедиатора (Foster, Fagg, 1984).

Классификация основных типов глутаматных рецепторов была предложена на основании данных электрофизиологического исследования по изучению действия наиболее широко известных аналогов молекулы глутамата — аспартата, каината, квисквалата и L-гомоцистеината (Foster, Fagg, 1984) (табл. 9). На основании взаимодействия рецепторов с этими производными были выделены 3—4 типа рецепторов: 1) рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA), блокируемые L-амино-4-фосфоновалериановой и 2-амино-5-фосфогептановой кислотами или A_1 -рецепторы; 2) рецепторы квисквалата, блокируемые диэтиловым эфиром глутаминовой кислоты, или A_2 -рецепторы; 3) рецепторы каината; 4) рецепторы 2-аминофосфономасляной кислоты (APB), блокаторами которых служат APB и α -аминоадипат или A_3 -рецепторы.

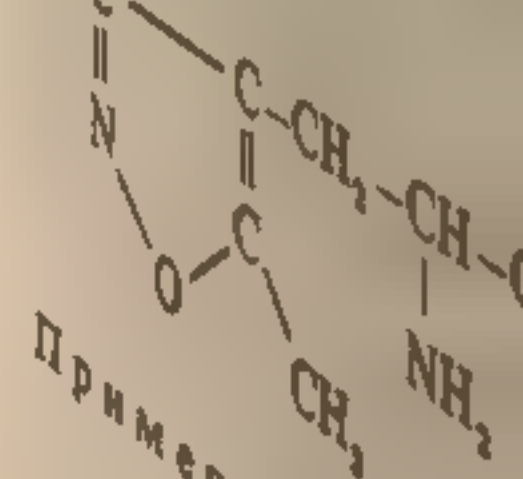
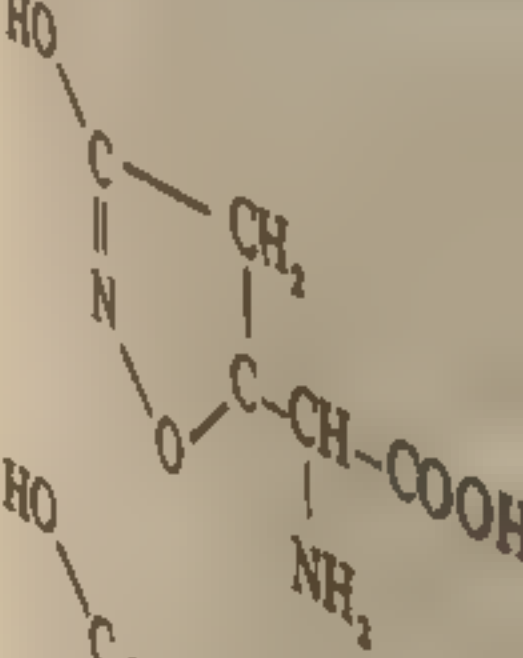
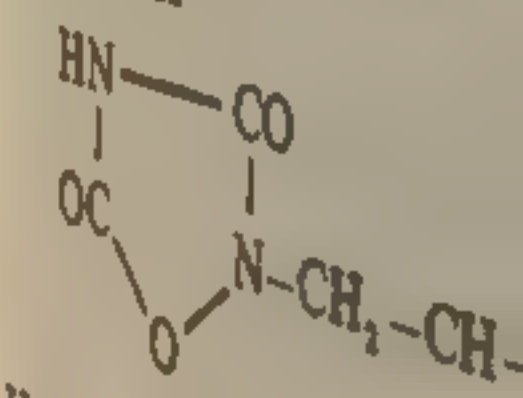
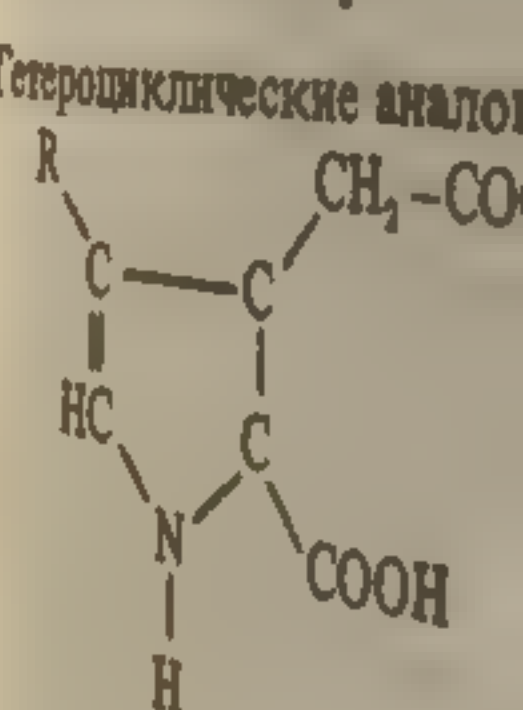
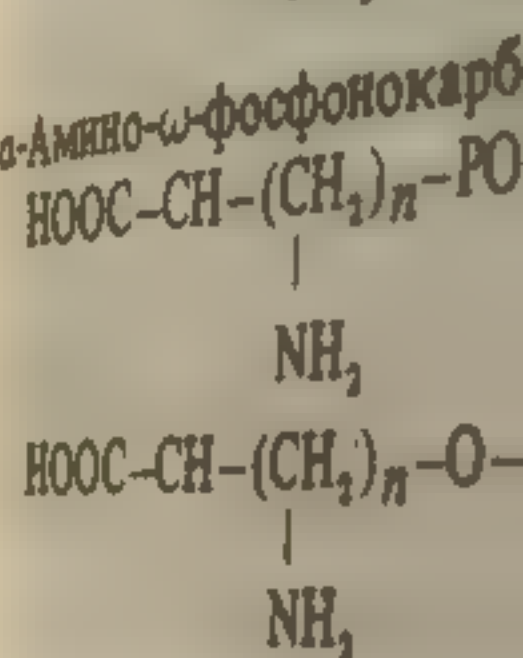
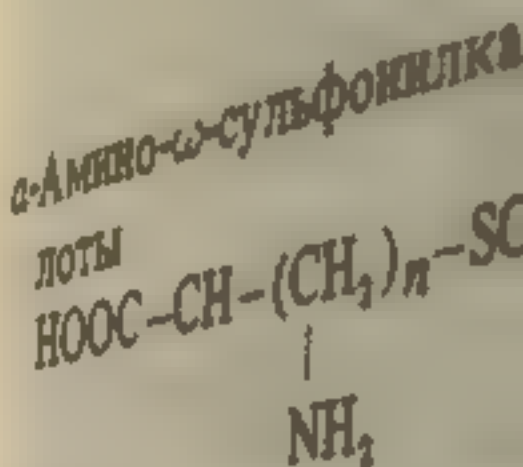
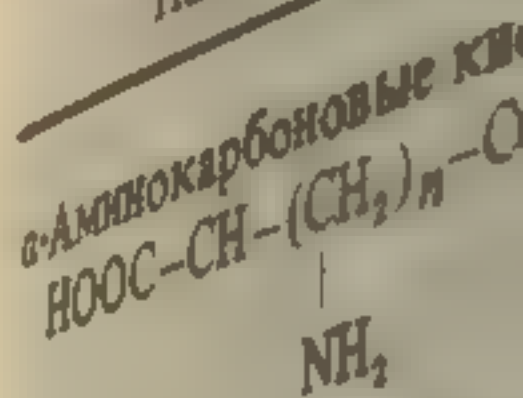
Следует сразу подчеркнуть, что приведенная классификация достаточно условна, в настоящее время не найден лиганд, селективно связывающийся с одним из типов глутаматных рецепторов. В таблице 10 представлены суммарные данные, касающиеся этих типов рецепторов для кислых возбуждающих аминокислот.

Таблица 9
Типы рецепторов кислых возбуждающих аминокислот (Foster, Fagg, 1984)

Аналоги L-глутамата	Типы глутаматных рецепторов			
	NMA	квисквалат	каинат	L-APB
Выраженные агонисты	L-NMA, D-NMA, иботенат АДСР, L-гомоцистеинат, D-глутамат	Квисквалат, виллардин, АМРА, L-глутамат, L-аспартат	Каинат, домоат	L-гомоцистеинат
Слабые агонисты	D-глутамат Квисквалат, L-глутамат, каинат	L-NMA, D-NMA, иботенат,	—	—
Антагонисты	L-APV, L-APH	GD EE	—	L-APB
Десенситизация рецепторов	+	+	—	α -D-аминоадипат —

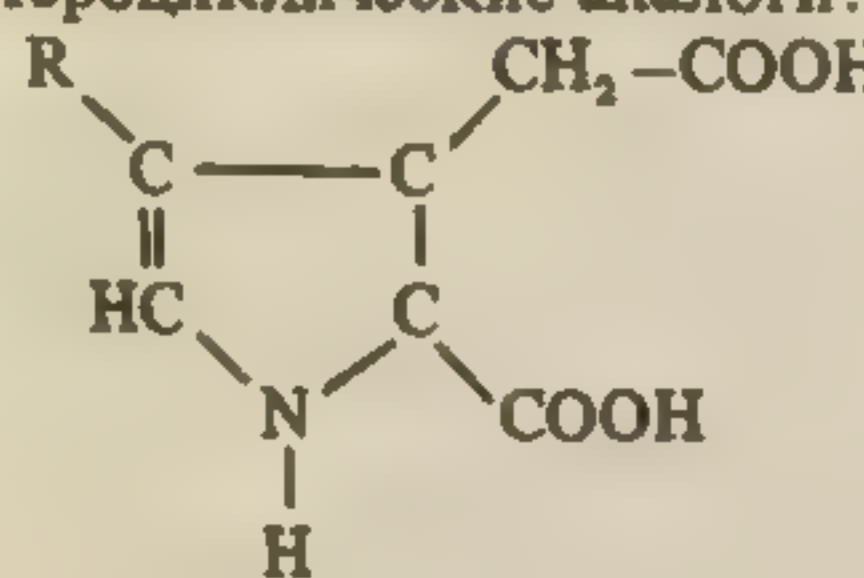
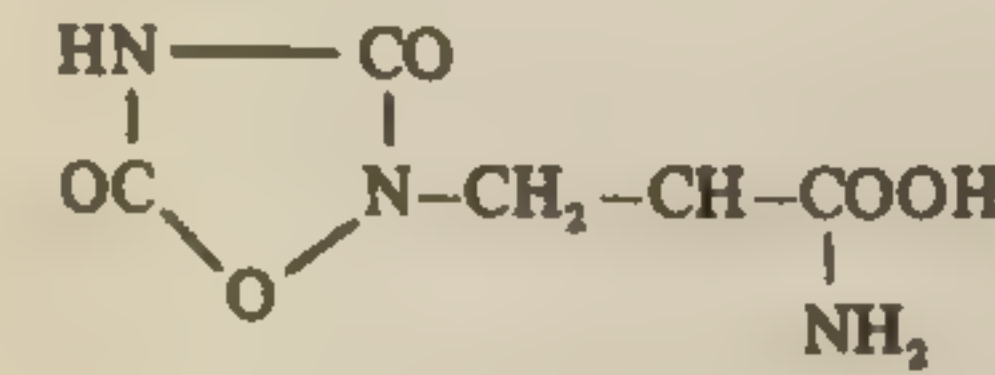
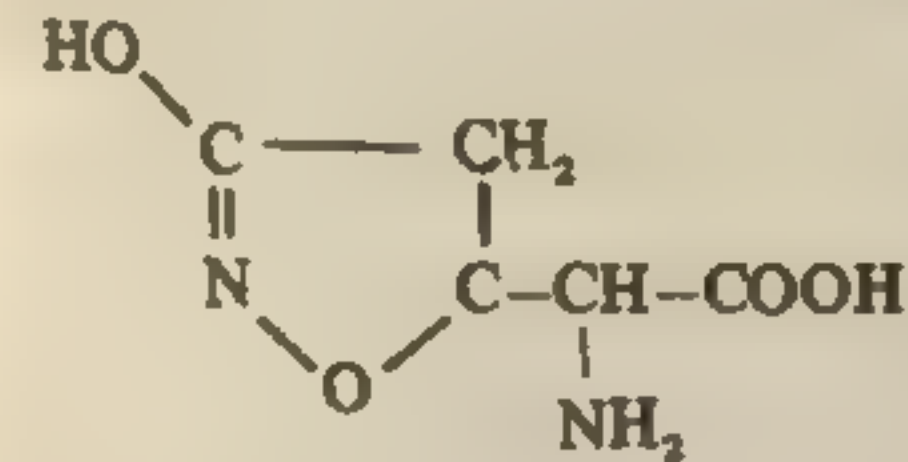
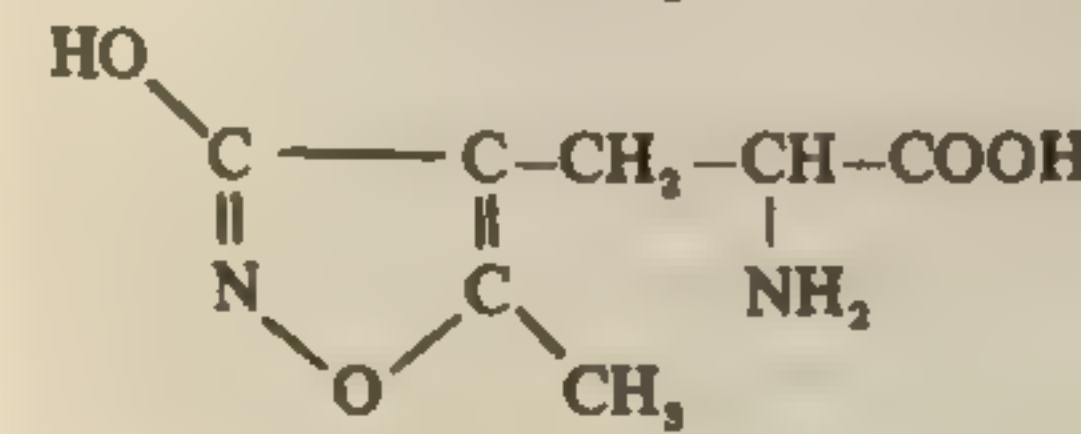
Примечание. NMA — N-метиласпартат; АДСР — цис-1-амино-1,3-дикарбоксициклопентан; L-APB — L-2-амино-4-фосфобутират; L-APV — L-2-амино-5-фосфоновалериат; L-APH — 2-амино-7-фосфогептанат; АМРА — α -амино-3-окси-5-метил-4-изоксазолпропионат; GD EE — диэтиловый эфир глутаминовой кислоты.

Структура кислых возбуждающих аминокислот (Foster, Fagg, 1984)
Наименование



Примечание. n — количество метиленовых групп. Большинство наиболее известных глутаматных рецепторов принадлежит к типу рецепторов, избирательными лигандами которых являются глутамат и другие типы рецепторов.

Структура кислых возбуждающих аминокислот и некоторых их аналогов
(Foster, Fagg, 1984)

Наименование и структура	Принятое название
α -Аминокислоты $\text{HOOC}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$	$n = 1$, аспартат $n = 2$, глутамат $n = 3$, α -аминоадипат
α -Амино- ω -сульфонилкарбоновые кислоты $\text{HOOC}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{SO}_3\text{H}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$	$n = 1$, цистеинат $n = 2$, гомоцистеинат
α -Амино- ω -фосфокарбоновые кислоты $\text{HOOC}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{PO}_3\text{H}_2$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$	$n = 2$, 2-амино-4-фосфо-бутират $n = 3$, 2-амино-5-фосфо-валериат
$\text{HOOC}-\text{CH}-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{NH}_2$	$n = 5$, 2-амино-7-фосфо-гептанат серин-о-фосфат
Гетероциклические аналоги: 	$\text{R} = -\text{C}=\text{CH}_2$ Каинат $\quad \quad $ $\quad \quad \text{CH}_3$
	$\text{R} = -\text{C}=\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH}$ $\quad \quad \quad \quad $ $\quad \quad \text{CH}_3 \quad \quad \text{CH}_3$ Домоат
	Квисквалат
	Иботенат
	α -Амино-3-окси-5-метил-4-изоксазол-пропионовая кислота

Примечание. n — количество групп $-\text{CH}_2-$, R — функциональная группа.

Большинство наиболее известных рецепторов L-глутамата принадлежит в настоящее время A_1 типу (Fagg, 1985). Для этого типа рецепторов были описаны антагонисты, из которых наиболее избирательными оказались фосфовые производные AP5 и AP7. Другие типы рецептора (A_2 и A_3) менее изучены по их фармакологическим характеристикам (табл. 11).

Таблица 11

Подтипы рецепторов аминокислот (цит. по: Fagg, 1985)

Характеристика аналогов глутамата	Номенклатура и тривиальное название		
	A ₁ NMDA	A ₂ квисквалатные	A ₃ каинатные
Наиболее мощные и селективные агонисты	Иботенат	Квисквалат, AMPA	Каинат, домоат
Наиболее мощные избирательные антагонисты	D-AP5, D-AP7	Glu-tau, GAMS	Glu-tau, GAMS
Рецепторная функция	Индукция длительной посттетанической потенциации Индукция судорожной активности		Индукция судорожной активности
Лечебное применение для антагонистов	Судороги Нейродегенеративные заболевания		В настоящее время неизвестно

Исследования по специфическому связыванию L-³H-глутамата с СМ в присутствии известных аналогов нейромедиатора выявили интересную зависимость. Оказалось, что рецепторное связывание L-³H-глутамата эффективно ингибировалось в присутствии как квисквалата, так и APV (табл. 12), которые, по данным литературы, взаимодействуют с разными типами узнающих центров глутаматного рецептора (Foster, Fagg, 1984). Поскольку обнаружены участки связывания L-³H-глутамата не изменяли своих параметров в присутствии диэтилового эфира и квискваловой кислоты, то предположено, что подобные рецепторные участки могут быть отнесены к типу так называемых «смешанных» APV-квисквалатных глутаматных рецепторов (Fagni et al., 1983; Fagg, 1985).

Таблица 12

Влияние известных аналогов L-глутамата на рецепторное связывание L-³H-глутамата с СМ головного мозга

Вещество	Эффективность (K _i , мкМ)
L-глутамат	0.35
Квисквалат	0.42
L-APV	3.5
L-аспартат	1.5
Глутамин	6.0
D-аспартат	60.0
NMDA	Не эффективно

Следует помнить, что аналоги нейромедиатора способны в той или иной степени взаимодействовать со всеми типами рецепторов, поэтому существующая классификация глутаматных рецепторов нуждается в уточнении на основании изучения их физиологических ответов на нейроны.

Существующая классификация глутаматных рецепторов позволяет судить о некоторых их свойствах: о структурной то-

похимии активного центра, аффинности к аналогам глутамата, об ионных механизмах действия. Вместе с тем этот подход к исследованию рецепторов, который можно сформулировать как путь «от функции рецептора к структуре», имеет пока существенные ограничения, так как не дает полного представления о структурных взаимоотношениях субъединиц рецептора, природе химических групп, составляющих узнающий и ионофорный участки рецептора. В этом случае необходимы биохимические исследования рецептора, позволяющие выбрать иной подход «от структуры рецептора к его функции», который дает возможность установить природу и свойства этих мембранных белков.

В связи со сказанным возникает вопрос: существует ли принципиальная возможность обобщить терминологию глутаматных рецепторов на основе изучения физико-химических свойств или вероятность классифицировать рецепторы глутамата по их структурной и анатомической локализации? Этот путь требует наличия специфических маркеров глутаматрецептивных путей ■ ЦНС. По-видимому, для преодоления неупорядоченности в терминологии глутаматных рецепторов требуется анализ молекулярных и иммунохимических признаков основных типов нейрорецепторов глутамата.

Таким образом, можно заключить, что изучение молекулярных механизмов взаимодействия L-глутамата и его структурных аналогов с мембраносвязанными рецепторами находится пока в стадии накопления фактов. Не во всех случаях подтверждается традиционная «трехточечная» схема структуры активного центра рецептора, особенно когда речь заходит об эндогенных ингибиторах связывания L-глутамата (Пиотровский, 1987). Дальнейший поиск структурных аналогов глутаматных рецепторов среди синтезированных пептидов, по-видимому, может помочь в выяснении структуры активного центра и соответственно в создании лекарственных средств нового поколения, обладающих выраженным антиэпилептическим действием. Структурное и метаболическое родство аспарагиновой и глутаминовой кислот, которое проявляется в сходстве их физиологических эффектов на нейроны, позволяет рассматривать глутаматные и аспартатные рецепторы как идентичные структуры, различающиеся между собой лишь ■ топохимии узнающего центра макромолекул. К настоящему времени в литературе обсуждают два вида рецепторных центров: аспартатные участки, активируемые N-метил-D-аспартатом (NMDA) и блокируемые α -аминоадипиновой (D- α AA) или 2-амино-5-фосфоновалериановой кислотой (APV), и глутаматные участки, активируемые квискваловой кислотой и ингибируемые диэтиловым эфиром глутаминовой кислоты (ДЭЭГ). Как считают Крышталь и др. (1986), существуют NMDA и не NMDA-рецепторы, которые соответствуют этим рецепторным типам участков связывания нейромедиатора. Между тем становится ясным, что отнесение того или иного синапса к числу глутамат- ■ аспартатчувствительных требует большой осторожности, так как для этого необходимы допол-

нительные сведения, касающиеся природы некоторых функциональных групп, входящих в структуру узнающего центра рецепторов.

Как видно из результатов наших исследований, кинетические параметры для рецепторного связывания L-³H-глутамата соответствуют моделям для одного типа участков связывания. С другой стороны, выявлены глутаматсвязывающие участки, имеющие иные кинетические зависимости, которые можно отнести к участкам поглощения и транспорта нейромедиатора.

Проведенный нами анализ взаимодействия глутамата с синаптическими мембранами в присутствии известных агонистов и антагонистов обнаружил следующие закономерности: наиболее эффективным ингибирующим действием обладали квисквалат и APV, в то время как НМДА, каиновая кислота и диэтиловый эфир глутаминовой кислоты практически не влияли на этот процесс. Очевидно, указанный тип рецепторного связывания L-глутамата соответствует смешанному типу глутаматных рецепторов.

Полагают, что активный центр глутаматных рецепторов содержит две катионные и одну анионную функциональные группы, способные взаимодействовать с реакционноспособными группировками самого нейромедиатора. Исходя из общих теоретических положений о реакционной способности глутамата сходные механизмы взаимодействия должны наблюдаться как для глутаматных рецепторов, глутаматутилизирующих ферментов, так и для глутаматтранспортных систем на мембране. Однако хорошо известно, что существуют химические соединения, которые избирательно действуют на эти разные процессы. С другой стороны, учет расстояний между α-аминогруппой и ε-карбоксилком нередко приводит к малоэффективному поиску новых аналогов, специфически конкурирующих с нейромедиатором за участки связывания на молекуле рецептора. Возможно, что учитываемое расстояние между атомом азота и одним из атомов кислорода на ε-карбоксильной группе, равное 5.4 нм, не имеет столь существенного значения для проявления избирательности действия агонистов и антагонистов рецептора.

Исходя из теоретического расчета и топологии активного центра глутаматного рецептора должны присутствовать четыре положительно заряженные функциональные группы, расположенные соответствующим образом для большей химической комплементарности к нейромедиаторам. Действительно, полученные в настоящей работе экспериментальные данные подтвердили справедливость высказанного предположения. Изучение влияния сдвоенных производных глутаминовой кислоты на рецепторное связывание и физиологические ответы нейрона обнаружили выраженный эффект их на глутаматные рецепторы. Причем наиболее активными оказались соединения с цепочкой между двумя остатками L-глутаминовой кислоты — $(\text{CH}_2)_n$ —, где $n=2$ и 8. Как показали наши исследования, наиболее эффективными были те изомеры, где большее число карбоксильных групп могло взаимодействовать с узнающим центром рецептора.

Наши предварительные расчеты расстояния между функционально значимыми группами совпадают с данными, полученными для никотиновых холинорецепторов, которые изучали с помощью бис-аммониевых соединений. Аналогичные расчеты, проведенные В. И. Скоком (1985), показали, что наиболее вероятные расстояния, определяемые между положительно заряженными группами самих бис-аммониевых соединений в устойчивой конформации колеблется в пределах 12.0 — 21.0 нм. Интересно отметить, что локализация возможных мест связывания этих производных на холинорецепторе соответствует отрицательно заряженным участкам узнающего центра молекулы рецептора, находящимся также на расстоянии около 8.0 нм.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЛУТАМАТСВЯЗЫВАЮЩИХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

3.1. Глутаматсвязывающая активность выделенных и очищенных препаратов синаптических мембранных белков

Одним из доказательств отличия хеморецепторных процессов от других систем клетки, которые утилизируют или транспортируют нейромедиатор в синапсах, являются данные, касающиеся характеристики очищенных рецепторных белков. В литературе уже описаны удачные попытки выделения глутаматсвязывающих мембранных белков с помощью самого нейромедиатора (Michaelis et al., 1975, 1979; Filbin et al., 1980). Появились попытки использовать для этой цели агонисты L-глутамата и природные нейротоксины (Ташмухамедов и др., 1973; Koshia, 1985). Последовательная очистка глутаматсвязывающих мембранных белков на аффинном сорбенте позволила выделить белки, способные избирательно связывать ряд агонистов и антагонистов глутаматных рецепторов (Michaelis et al., 1984).

Другой подход для выделения этих белков использовали Физер де Плаза и Де Робертис (Fischer de Plazas, De Robertis, 1974). Они показали, что экстракция белков с помощью хлороформметаноловой смеси дает возможность выделить две гидрофобные фракции протеолипидов с тремя участками высокоаффинного связывания глутамата: $K_d = 0.3, 5$ и 55 мкМ. Было найдено, что эти протеолипиды имеют молекулярную массу в пределах 32 и 45 кД (De Robertis, Fischer de Plazas, 1976, 1977). Однако в связи с малой растворимостью полученных протеолипидов другие их свойства практически не были изучены. Было только показано, что связывание C^{14} -L-глутамата одной из этих фракций сильно ингибировалось метилглутаминовой кислотой, α -нуциферинном и диэтиловым эфиром глутаминовой кислоты (Lunt, 1973). Однако до сих пор пока неясно, являются ли выделенные протеолипиды рецепторами для глутамата.

В более поздних работах группы Михаэлиса (Michaelis et al., 1984a) были описаны выделение и очистка глутаматсвязывающего белка из головного мозга быка. По своим характеристикам (M_r — 14 кД, pI — 4.7, K_d — 0.87 мкМ) полученный белок оказался аналогичным ранее выделенному из мозга крыс. В полном соответ-

ствии с результатами предыдущих исследований он характеризовался наличием в активном центре рецептора группы Fe_2S_2 и значительным (до 20 %) содержанием углеводов. Коэффициенты седиментации диссоциированной и ассоциированной формы рецептора колебались от 2.1 до 3.5 S в присутствии избытка L-глутамата. Авторы предположили, что глутаматный рецептор имеет олигомерную структуру и состоит из двух или четырех субъединиц, связанных между собой дисульфидными связями.

В табл. 13 даны сравнительные данные, касающиеся некоторых физико-химических параметров, известных к настоящему времени для холинорецепторов (Changeux et al., 1980; Adams, 1981; Stroud, Moog, 1985) и глутаматных рецепторов (Michaelis et al., 1984; Ташмухамедов и др., 1985).

Как видно из таблицы, многие характеристики глутаматных рецепторов нуждаются в дополнительных исследованиях. Вместе с тем даже на основании этих предварительных данных можно выявить ряд общих закономерностей в структурной организации рецепторных комплексов. Так, легко видеть, что глутаматные рецепторы представляют собой сложные олигомеры, минимальной функциональной единицей которых, возможно, является тетрамер. Молекулярная масса тетрамерных субъединиц глутаматных рецепторов является сравнительно небольшой по сравнению с холинорецептором. С другой стороны, изоэлектрические точки их белковых компонентов сравнительно близки, как и содержание углеводных и липидных компонентов.

Обращает внимание, что установление первичной последовательности аминокислот всех четырех субъединиц холинорецептора указывает на значительную гомологию между составляющими его полипептидами (Raftery et al., 1980). Тот факт, что даже после активного протеолитического воздействия рецепторы ацетилхолина продолжают функционировать, свидетельствует о значительной агрегации субъединиц, формирующих ионный канал (Nicho et al., 1986). При изучении высокоаффинного связывания с агонистами и антагонистами для холинорецептора было показано, что наибольший вклад в формирование узнающих центров рецепторной макромолекулы вносит α -субъединица, в то время как неконкурентные блокаторы ионного канала связываются преимущественно с α -субъединицей (Heidemann, Changeux, 1978; Kistler et al., 1982).

Наиболее полную картину структурной организации холинорецепторов позволили получить методы рассеяния нейтронов и дифракции рентгеновских лучей, а также электронная микроскопия высокого разрешения (Nicho et al., 1986). На основании этих данных была представлена теоретическая модель холинорецепторного комплекса (рис. 12).

Для изучения молекулярных характеристик изолированных рецепторов L-глутамата, к сожалению, не существовало таких благоприятных предпосылок, как в случае с никотиновыми холинорецепторами (нХР). Первые эксперименты по использованию гру-

Таблица 13

Физико-химические свойства холинорецептора и глутаматного рецептора

Параметры	Холинорецептор (никотиновый)		Глутаматный рецептор		
	мономер	димер	моно- мер	тетра- мер	олиго- мер
Молекулярная масса	250 кД	500 кД	14 кД	56—71 кД	263 кД
Коэффициент седиментации	9	13	2.1	3.5	—
Стоксовский радиус	7 нм	9 нм	—	—	—
Радиус (по методу нейтронной дифракции)	4.6 нм	—	—	—	—
Изоэлектрическая точка	4.9	4.9	4.7	4.7	4.7
Стехиометрия субъединичного состава	$\alpha_2\beta\gamma\delta$	$\alpha_2\beta\gamma\delta$ -S-S- $\alpha_2\beta\gamma\delta$	—	—	—
Молекулярная масса субъединиц	α — 40 кД β — 50 кД γ — 60 кД δ — 65 кД	—	α — 14 кД β — 18 кД γ — 32 кД	—	—
Константа связывания с нейротоксинами	8 нМ/мг	8 нМ/мг	—	—	—
Константа связывания с нейромедиатором мембраносвязанного рецептора	8 нМ/мг	8 нМ/мг	8.6 нМ/мг	—	10.0 нМ/мг
Константа связывания с солюбилизованным рецептором	—	80 нМ/мг	800 нМ/мг	—	1000 нМ/мг
Углеводный состав	4—7 % всех субъединиц (глюкозамин, манноза, глюкоза, галактоза, сиаловая кислота)		20 % (глюкоза, манноза, галактоза, N-ацетилглюкозамин)		

бых фракций нейротоксинов, выделенных из яда пауков, для очистки глутаматных рецепторов не нашли пока распространения (Ташмухамедов и др., 1983; Kawai et al., 1984). Это связано с отсутствием достаточных количеств очищенных фракций нейротоксинов, необходимых для препаративного выделения глутаматсвязывающих белков. Поэтому до сих пор основными критериями выделения и очистки глутаматсвязывающих мембранных белков по-прежнему остаются параметры радиолигандного связывания белков с самим нейромедиатором и / или его аналогами (Дамбинова, Беседин, 1982). Так, нами было показано, что при солюбилизации общей фракции мембранных белков в присутствии тритон X-100 было выявлено, что повышение его концентрации от 0.6 до

Рис. 12. Схема пространственного строения рецептора (et al., 1986).

1.2 % существенно не в использовании 0.5 % дельта-синаптического Предварительные эксперименты удаляли практически с плазматических компонентов близкого (1984). Фракционирование белков в градиенте глутамата, причем соотношение в области 60—12 кДа бытком меченого

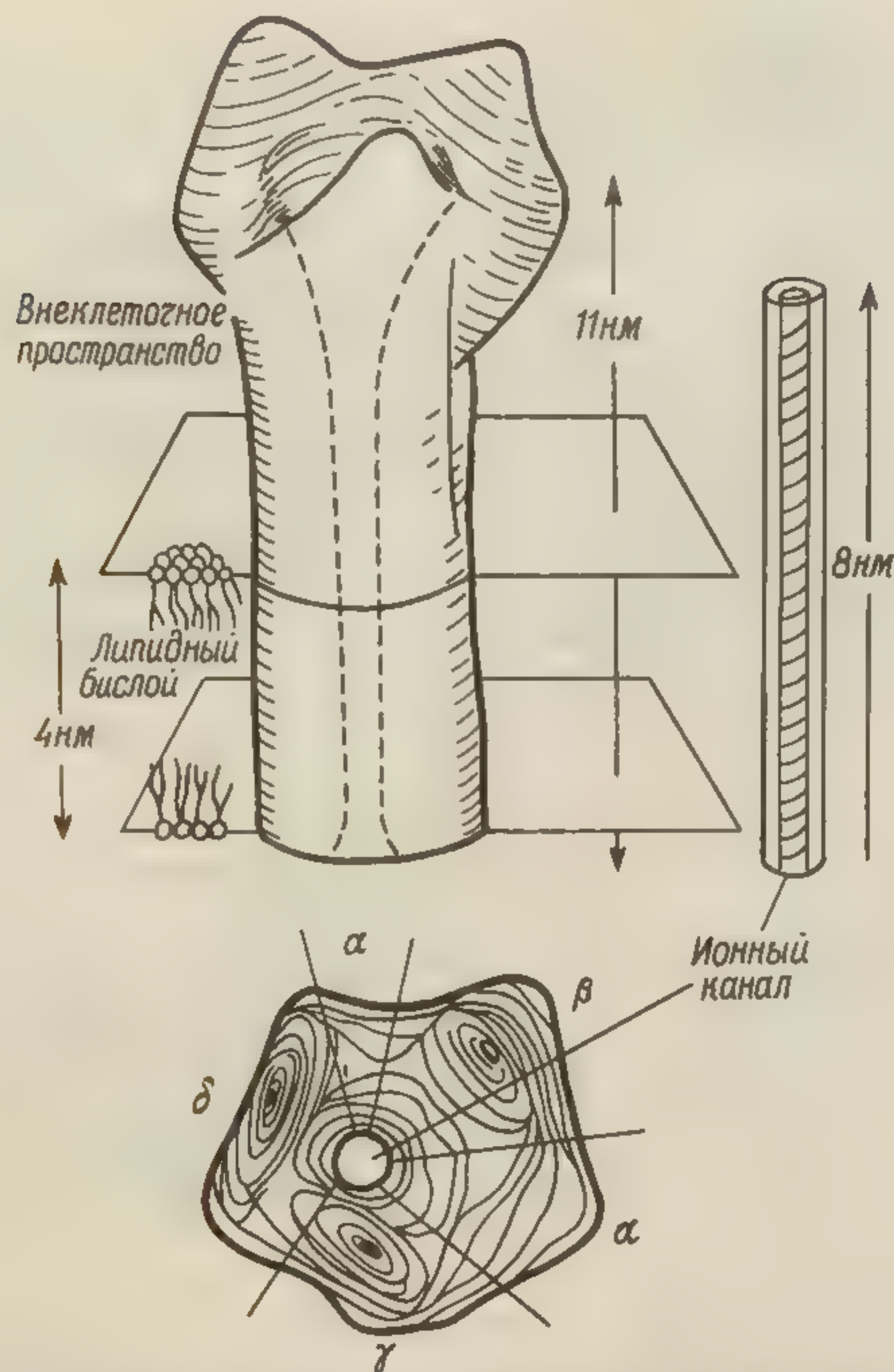


Рис. 12. Схема пространственной организации н-холинорецептора (по: Nischo et al., 1986).

1.2 % существенно не влияет на выход растворимых белков. При использовании 0.5 % дезоксихолата натрия «снималось» около 45—50 % синаптических белков. Наиболее оптимальным оказалось использование для солюбилизации дезоксихолата натрия. Предварительные эксперименты показали, что эти детергенты удаляли практически всю глутаматсвязывающую активность с плазматических синаптических мембран, что свидетельствовало о вероятности близкого расположения глутаматузнающих рецепторных компонентов на поверхности мембраны (Дамбинова и др., 1984).

Фракционирование солюбилизированных тотальных синаптических белков в градиенте глицерина 5—15 % выявило три основных пика, причем наибольший процент связывания радиоактивного глутамата соответствовал низкомолекулярной зоне градиента в области 60—12 кДа. Преинкубация синаптических белков с избытком немеченого глутамата перед центрифугированием в гради-

енте глицерина сдвигала зону радиоактивности в легкую область градиента, что свидетельствовало в пользу специфичности связывания радиоактивного глутамата с солюбилизованными белками.

На рис. 13 представлены профили элюции низкомолекулярных мембранных белков через глутаматсефарозу. Видно, что первый пик соответствует мембранным белкам, не связавшимся на сорбенте, в то время как второй пик снимается при повышенной ионной силе. Это свидетельствует о сродстве фракции мембранных белков к глутамату. Поскольку присоединение глутамата к сефарозе идет через аминоксильные группы и связывающие участки нейромедиатора хорошо доступны для рецептора, то можно предполагать, что сохранение карбоксильных групп на «пришитой» молекуле глутамата играет важную роль во взаимодействии нейромедиатора с «узнающим» центром рецепторной макромолекулы.

Следующий этап очистки белков, обладающих сродством к глутамату, проводили на КонА-агарозе (рис. 14). Выделенные глутаматсвязывающие белки сорбировали на КонА-агарозе и элюировали в присутствии 0.5 % раствора N-метил- α -маннопиранозиды. КонА-растительный лектин связывался обычно с углеводными группировками белковых молекул, следовательно, анализируемая фракция мембранных белков представляла собой гликопротеин. Эти результаты подтверждают данные Михаэлиса (Michaelis, 1975, 1979) о гликопротеиновой природе глутаматсвязывающих мембранных белков.

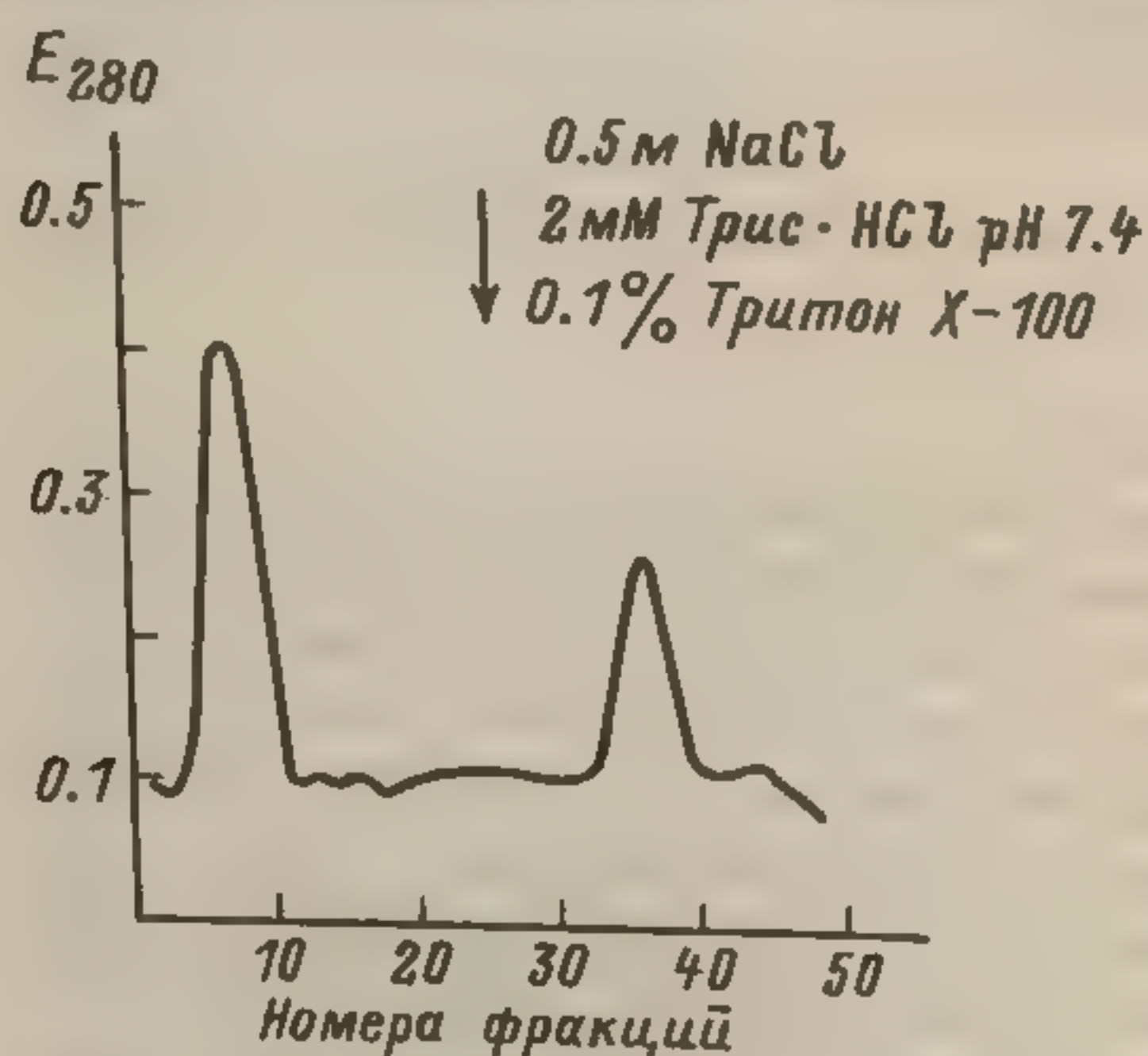


Рис. 13. Аффинная хроматография на глутамат-сефарозе 4В низкомолекулярной фракции синаптических мембранных белков.

Стрелка — момент повышения ионной силы элюирующего буфера. По оси абсцисс — номер фракции; по оси ординат — величина экстинкции при длине волны 280 нм.

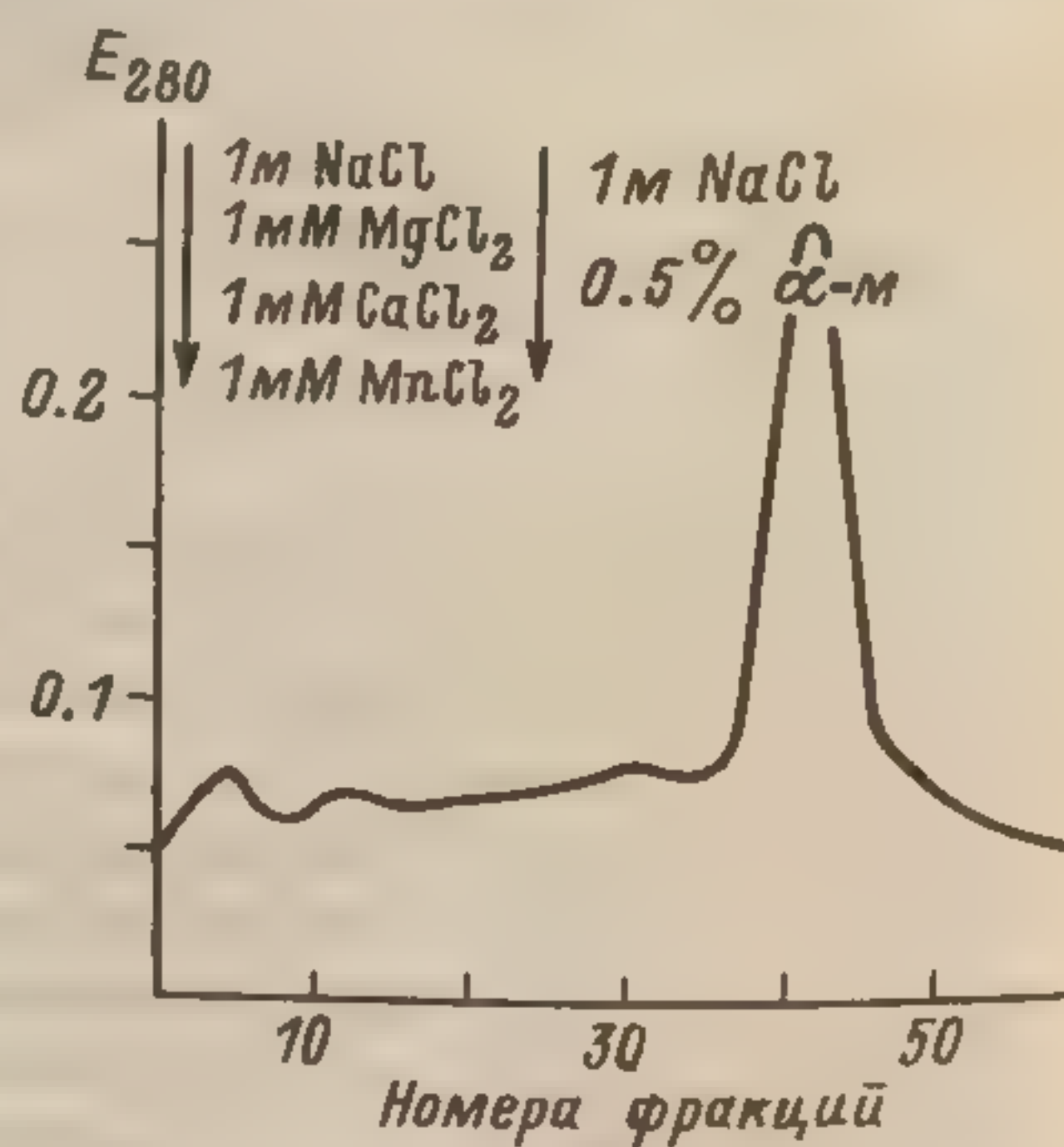


Рис. 14. Аффинная хроматография на конканавалин А-агарозе глутаматсвязывающей фракции белков.

Стрелка — момент смены элюирующего буфера на 0.5 % α -метилманнопиранозид содержащий буфер (α -м). По оси абсцисс — номер фракции; по оси ординат — величина экстинкции при длине волны 280 нм.

Исследование глутаматсвязывающей активности выделенных после аффинной хроматографии мембранных белков показало, что на последней стадии очистки связывание белковых фракций возрастало в более чем 500 раз по сравнению с глутаматсвязывающей активностью исходных тотальных фракций синаптических белков. Анализ электрофоретической подвижности очищенных двуступенчатой хроматографией белковых фракций в денатурирующих и нативных условиях (Дамбинова, Беседин, 1982) показал, что ГМБ имеют молекулярную массу в области 56—60 кДа, а при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия эта фракция имела сравнительно гомогенный пик в области 14 кДа.

Для того чтобы выяснить вопрос о компонентном составе белковых фракций ГМБ, мы провели разделение ГМБ на колонках TSK-3000 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Оказалось, что ГМБ легко образует олигомеры разной молекулярной массы. Однако, как выяснилось, олигомеризация белковых фракций имеет свои закономерности: при изменении pH элюирующего буфера можно было добиться перераспределения белковых пиков на хроматограммах, причем сдвиг происходил как в высокомолекулярную область (при нейтральных pH), так и в низкомолекулярную зону (при кислых pH) (Дамбинова и др., 1987а). Спектр белковых компонентов, содержащихся в очищенном препарате ГМБ, можно разделить на высокомолекулярные и низкомолекулярные фракции, соответствующие по молекулярным массам 112, 54 и 14 кДа. Определение глутаматсвязывающей активности в каждой фракции свидетельствует о том, что все они обладают высоким сродством к L-³H-глутамату. Возможно, что высокомолекулярные компоненты представляют собой олигомеры из субъединиц, имеющих массу 14 кДа, так как их предполагаемые молекулярные массы кратны 4 и 8 субъединицам ГМБ (Дамбинова и др., 1987а).

В последние годы появились сообщения, подтверждающие предположение о том, что нативный глутаматный рецептор существует внутри синаптической мембраны в агрегированном состоянии. Предполагают, что выделенная при солюбилизации фракция глутаматсвязывающих мембранных белков (ГМБ) с молекулярной массой 13.8 кДа является только фрагментом (субъединицей) полного хеморецепторного комплекса. Эти выводы сделаны на основании измерений молекулярного размера участков синаптических мембран, специфически связывающих L-глутамат и квискалат методом радиационной инактивации (Bardsley et al., 1985).

Так, в работе Хонора и Нильсона (Honore, Neelsen, 1985) с помощью линейного ускорителя электронов облучали предварительно замороженные синаптические мембраны. Было обнаружено, что оттаявшие после замораживания синаптические мембраны содержат глутаматсвязывающий участок с молекулярной массой (75 ± 13) кДа в отсутствие L-глутамата и в присутствии нейромедиатора — (263 ± 34) кДа. Возрастание молекулярной массы

■ присутствии L-глутамата предполагает возможность спонтанного соединения рецепторных субъединиц (эффекторного участка и натриевых каналов). Авторы на основании этой работы делают вывод, что молекулярные размеры различных типов глутаматного рецептора близки между собой или что при использовании L-глутамата ■ качестве субстрата методом радиационной инактивации измеряется размер рецепторов только одного типа, ■ именно L-АРВ (α -аминофосфономасляные глутаматные рецепторы).

При исследовании другого типа глутаматных рецепторов — квисквалатных (Honore, Neelsen, 1985) использовали радиоактивный α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионат (^3H -АМРА). При облучении замороженных синаптических мембран электронами высокой энергии (доза 0—20 трад) обнаружили двуступенчатую инактивацию рецептора, которая происходит за счет деструкции высокомолекулярного модуляторного участка макромолекулы рецептора. Авторы полагают, что молекулярная масса полного квисквалат-чувствительного хеморецепторного комплекса составляет 155 кДа. На основании этих результатов предполагается, что функционирование исследованных подтипов глутаматных рецепторов регулируется с помощью высокомолекулярных субъединиц, которые являются посредниками, отвечающими на различные регулирующие факторы.

Полученные данные подтверждают гипотезу об олигомерной структуре глутаматных рецепторов всех подтипов. Однако до сих пор остается не решенным вопрос о том, какие типы рецепторов связаны с непосредственной регуляцией ионных каналов, а какие — с регуляцией, опосредованной через систему циклических нуклеотидов и других модуляторов.

Изучение механизмов рецепторного связывания глутамата с очищенными белками ставит вопрос о специфичности очищенных препаратов ГМБ по отношению к различным агонистам и самому нейромедиатору. Особенно этот вопрос важен для L-глутамата, т. к. известно, что эта аминокислота не обладает абсолютной специфичностью к рецепторам и способна взаимодействовать в качестве субстрата со многими глутаматутилизирующими ферментами или глутаматтранспортирующими мембранными белками. Сравнительно широкая специфичность L-глутамата подразумевает, что в основе активирования рецепторного связывания лежат определенные особенности свойств узнающих участков, которые необходимо исследовать с помощью конкурентных и неконкурентных ингибиторов.

Следует отметить, что высокомолекулярные компоненты солюбилизованных глутаматсвязывающих белков мембран легко инактивировались при выделении, т. е. теряли способность связывать L- ^3H -глутамат и требовали осторожности при их исследовании. Одним из путей сохранения длительной стабильности этих рецепторных белков явилось добавление небольших количеств липидов (соотношение холестерин:фосфолипиды=1:1) на последней стадии очистки. Стабильность полученных мембранных белков

Рис. 15. Связывание L- ^3H -глутамата с очищенными мембранными белками. Остальные обозначения см. в тексте.

также возрастала при времени полунинактивации. Для выяснения парамолекулярной фракции использованы условия с синаптическими мембранами.

насыщение связывающего L- ^3H -глутамата не достигло более высокие концентрации радиоактивного от концентрации L-глутамата. насыщение глутаматсвязывающей концентрации 1 мМ глутамата на линейном участке однородной популяции с K_d 800—1000 нМ и V_{max} 180—200 пмоль/мг.

Как было нами ранее глутаматсвязывающие параметры: K_d 180—200 пмоль/мг. Легко видеть, что после из синаптических мембран резко изменяется. Подсчитано (Michaelis et al., 1981a) рецепторного белка, в среднем 650—800 нМ, в то время как K_d около 200—300 нМ. снижению родства мембранного белка с глутаматом, изменением микротопологии мембраны в ходе выделения и очистки. Определение величин

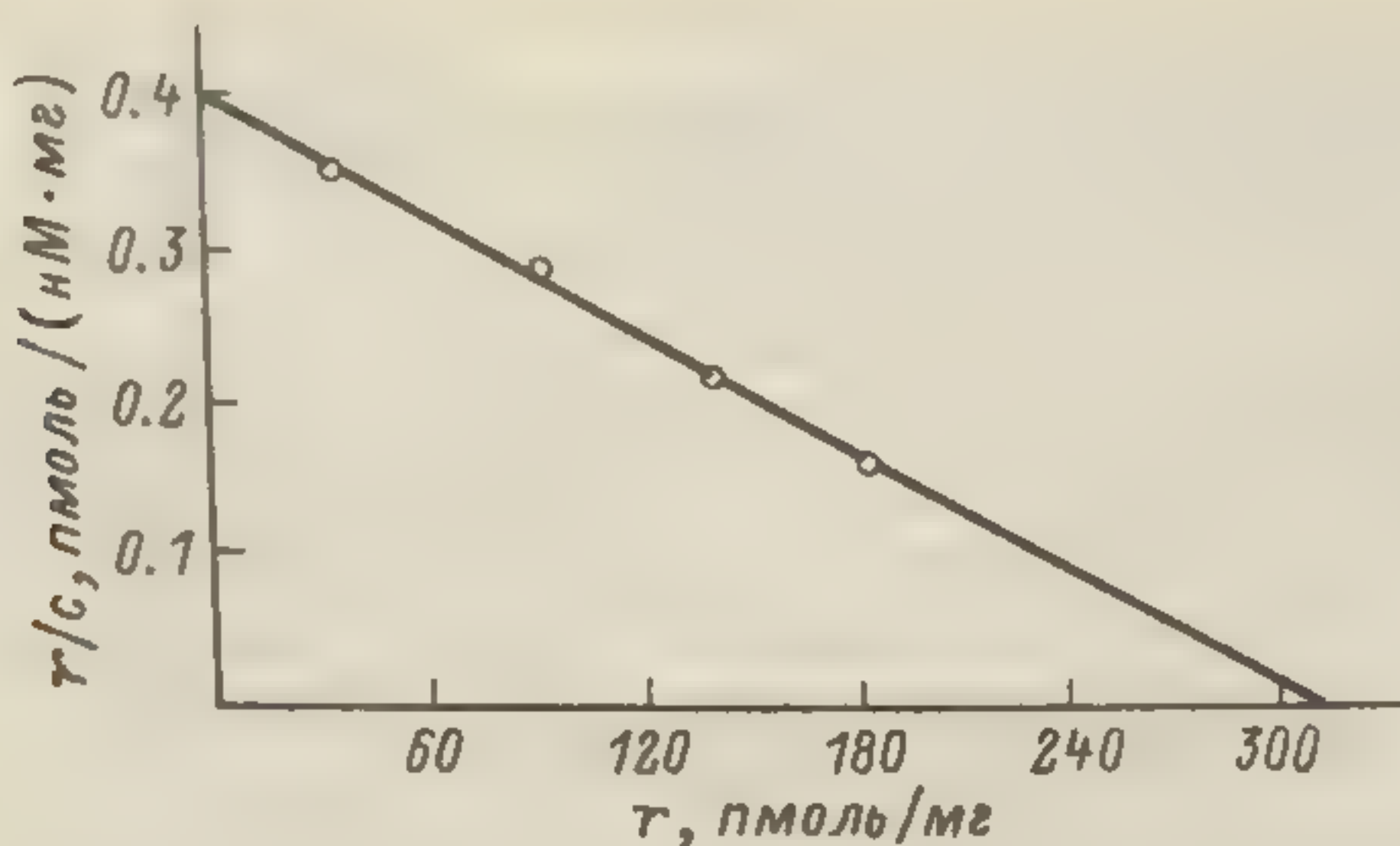


Рис. 15. Связывание L - 3H -глутамата с очищенными фракциями глутаматсвязывающих мембранных белков (данные представлены в координатах Скэтчарда).

Остальные обозначения как на рис. 5,б.

также возрастала при понижении окружающей температуры: время полуинактивации при $0-+4^\circ C$ составляло около 36—48 ч.

Для выяснения параметров связывания L - 3H -глутамата с низкомолекулярной фракцией солюбилизованного рецептора были использованы условия инкубации, аналогичные для связывания с синаптическими мембранами. Оказалось, что в этих условиях насыщение связывающих участков при низких концентрациях L - 3H -глутамата не достигалось. В связи с этим были использованы более высокие концентрации связывающегося лиганда. Связывание радиоактивного глутамата с очищенными ГМБ зависело от концентрации L -глутамата. По данным В. И. Беседина (1987) насыщение глутаматсвязывающих участков происходило при концентрации 1 мМ глутамата. Анализ данных в координатах Скэтчарда на линейном участке связывания свидетельствовал о наличии однородной популяции глутаматсвязывающих участков с K_d 800—1000 нМ и V_{\max} 280—300 пмоль / мг белка (рис. 15).

Как было нами ранее показано, в мембраносвязанной форме глутаматсвязывающие рецепторные участки имели следующие параметры: K_d 180—200 нМ и V_{\max} 2.5—4.5 пмоль/мг белка. Легко видеть, что после солюбилизации глутаматного рецептора из синаптических мембран характер связывания нейромедиатора резко изменяется. Подобный эффект наблюдали Михаэлис и соавт. (Michaelis et al., 1981a), которые показали, что K_d для очищенного рецепторного белка, связывающего глутамат, колебалось в пределах 650—800 нМ, в то время как мембраносвязанный рецептор имел K_d около 200—300 нМ. Авторы предположили, что такое снижение сродства медиатора к рецептору обусловлено, по-видимому, изменением микроокружения белка, в частности нарушением белок-липидного взаимодействия. С нашей точки зрения, подобный эффект может вносить вклад также нарушение стехиометрии субъединиц рецептора и их пространственной организации в ходе выделения и очистки.

Определение величины K_d для очищенного препарата ГМБ

служит не только для выявления соотношения между концентрацией $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата и связывающей функцией рецептора. Очевидно, что изучение этой величины для очищенного препарата ГМБ в присутствии фактора ингибирующего связывание (ФИС) $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата (Городинский, Дамбинова, 1986) позволит судить о механизме реакции насыщения узнающих участков рецептора и процессах их активирования. В этом случае при определении K_d для ФИС мы поддерживали концентрацию $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата на уровне насыщения и измеряли влияние концентрации ФИС на кинетику связывания радиоактивного глутамата.

На рис. 16 представлены графики Скэтчарда для связывания $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата с очищенными фракциями ГМБ в присутствии ФИС, выделенного нами ранее (Городинский, Дамбинова, 1986). Оказалось, что в присутствии разных концентраций ФИС K_d резко изменяется в сторону снижения сродства нейромедиатора к рецептору. Обратимое ингибирование, которое мы наблюдали для ФИС, можно, по-видимому, отнести к процессу конкурентного ингибирования, так как увеличение концентрации L -глутамата в инкубационной среде влияло на реакцию связывания ФИС с ГМБ. Очевидно, ФИС и L -глутамат конкурируют за одни и те же участки связывания, которые находятся в активном центре макромолекулы рецептора. В этом случае, как было показано, степень ингибирования связывания $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата зависит не от абсолютной концентрации ФИС, а от соотношения концентраций $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата и ФИС. Так, например, выяснилось, что при соотношении концентраций ФИС и L -глутамата 50:1 реакция связывания ингибировалась на 50 % независимо от абсолютных концентраций этих компонентов.

Полученные данные позволяют рассчитать K_i для фиксированной концентрации $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата и ГМБ, соответствующей 50 % насыщения. Для ФИС $K_i = 0.58$ мкг/мл.

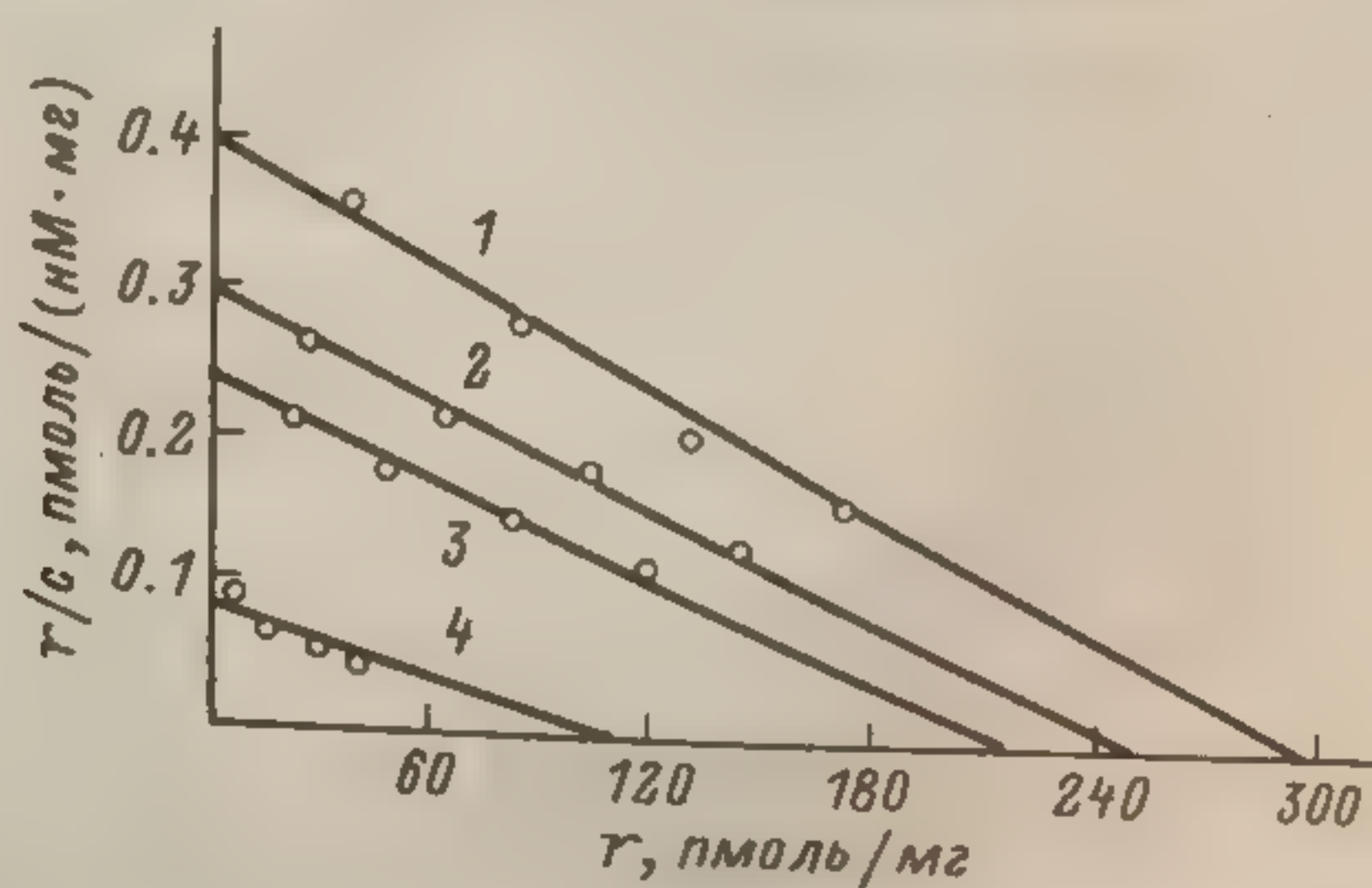


Рис. 16. Связывание $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата с очищенными фракциями глутаматсвязывающих мембранных белков (координаты Скэтчарда) в присутствии разных концентраций фактора, ингибирующего связывание.

1 — контроль; 2 — 10 мкг; 3 — 20 мкг; 4 — 30 мкг в инкубационной среде. Остальные обозначения, как на рис. 5, 6.

Таблица 14

Связывание L-³H-глутамата с очищенными фракциями ГМБ в присутствии известных аналогов L-глутамата

Препарат	Агонисты	K _d , мкМ	Ингибирование от контроля, %
Очищенные фракции ГМБ из головного мозга крысы	NMDA	0.85	32
	Квисквалат	0.43	66
	L-APV	0.32	60
	ФИС	0.08	90
	L-глутамат	0.80	100

Помимо ФИС конкурентными ингибиторами связывания L-³H-глутамата с очищенными фракциями ГМБ оказались известные агонисты L-глутамата, такие как NMDA, квисквалат и APV (аминофосфоновалериановая кислота). В табл. 14 представлены значения K_d для этих соединений.

Из таблицы видно, что наиболее эффективным конкурентным действием, ингибирующим связывание радиоактивного глутамата с очищенными препаратами ГМБ, оказался ФИС, выделенный нами ранее из элюата синаптических мембран (Городинский, Дамбинова, 1986). Установление природы ФИС в последующих исследованиях позволит сделать вывод о строении каталитического центра глутаматного рецептора, который, по-видимому, должен быть комплементарным, наиболее эффективным агонистам молекулы L-глутамата.

С другой стороны, несомненный интерес исследователей должны вызывать аналоги глутаминовой кислоты или природные соединения, обладающие неконкурентным ингибирующим действием на связывание L-³H-глутамата. В качестве одного из таких возможных ингибиторов нами были исследованы некоторые фракции яда паука *Argiopa lobata*,* известные своим блокирующим действием только на Na-зависимые ионные каналы, управляемые L-глутаматом, а не на глутаматузнающие участки в нервно-мышечных синапсах насекомых (Usherwood et al., 1984). Для ферментов неконкурентное ингибирование отличается от конкурентного тем, что оно не может быть ослаблено или устранено увеличением концентрации субстрата. Поэтому предполагают, что при неконкурентном ингибировании ингибитор связывается с ферментом на участке, отличающемся от активного центра.

В случае изучения рецепторного связывания L-³H-глутамата с очищенными препаратами ГМБ мы наблюдали аналогичные закономерности. Так, очищенные фракции аргиопина оказались способными ингибировать специфическое связывание радиоак-

* Автор приносит глубокую признательность д. х. н. Е. В. Гришину и к. х. н. Т. М. Волковой (Ин-т биоорганической химии АН СССР, Москва) за предоставленные фракции яда паука *Argiopa lobata* и очищенный препарат аргиопина.

ного глутамата с изолированными препаратами ГМБ. На рис. 17 представлены графики Скэтчарда для связывания $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата с очищенными препаратами ГМБ в присутствии разных концентраций аргиопина. Как видно из данных, при неконкурентном ингибировании графики различаются между собой по расстоянию между наклонами кривой, т. е. по величине $B_{\text{макс.}}$. Действительно, при добавлении субстрата, в данном случае L -глутамата в среду инкубации, реакция связывания радиоактивной метки с ГМБ не изменяла своего характера, а увеличивалось лишь количество участков связывания. Легко видеть, что в основе этого явления лежит обратимое взаимодействие аргиопина с такими группами макромолекулы рецептора, которые не принадлежат активному центру узнающего участка рецептора глутамата. Значение константы ингибирования для аргиопина по предварительным данным составляет $K_i = 2.54$ мкг/мл.

Эти данные хорошо подтверждаются в исследованиях специфического связывания $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата с синаптическими мембранами в присутствии аргиопина. В табл. 15 представлены результаты анализа ингибирования глутаматсвязывающей активности синаптических мембран в присутствии разных фракций яда паука *Argiopa lobata*. Предварительное фракционирование интактного яда, выделенного из паука, показало наличие в составе яда фракций, способных ингибировать связывание $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата с синаптическими мембранами мозга крыс (фракция Арг-1-2).

Как видно из табл. 15, низкомолекулярные фракции яда, к которым относится и аргиопин, практически не влияют на рецепторное связывание L -глутамата с синаптическими мембранами. Эти результаты хорошо согласуются с данными электрофизиологических экспериментов при изучении функции глутаматных рецепторов в нервно-мышечных синапсах (Магазаник и др., 1986).

Вместе с тем нами были обнаружены факты значительного конкурентного подавления высокомолекулярными фракциями яда

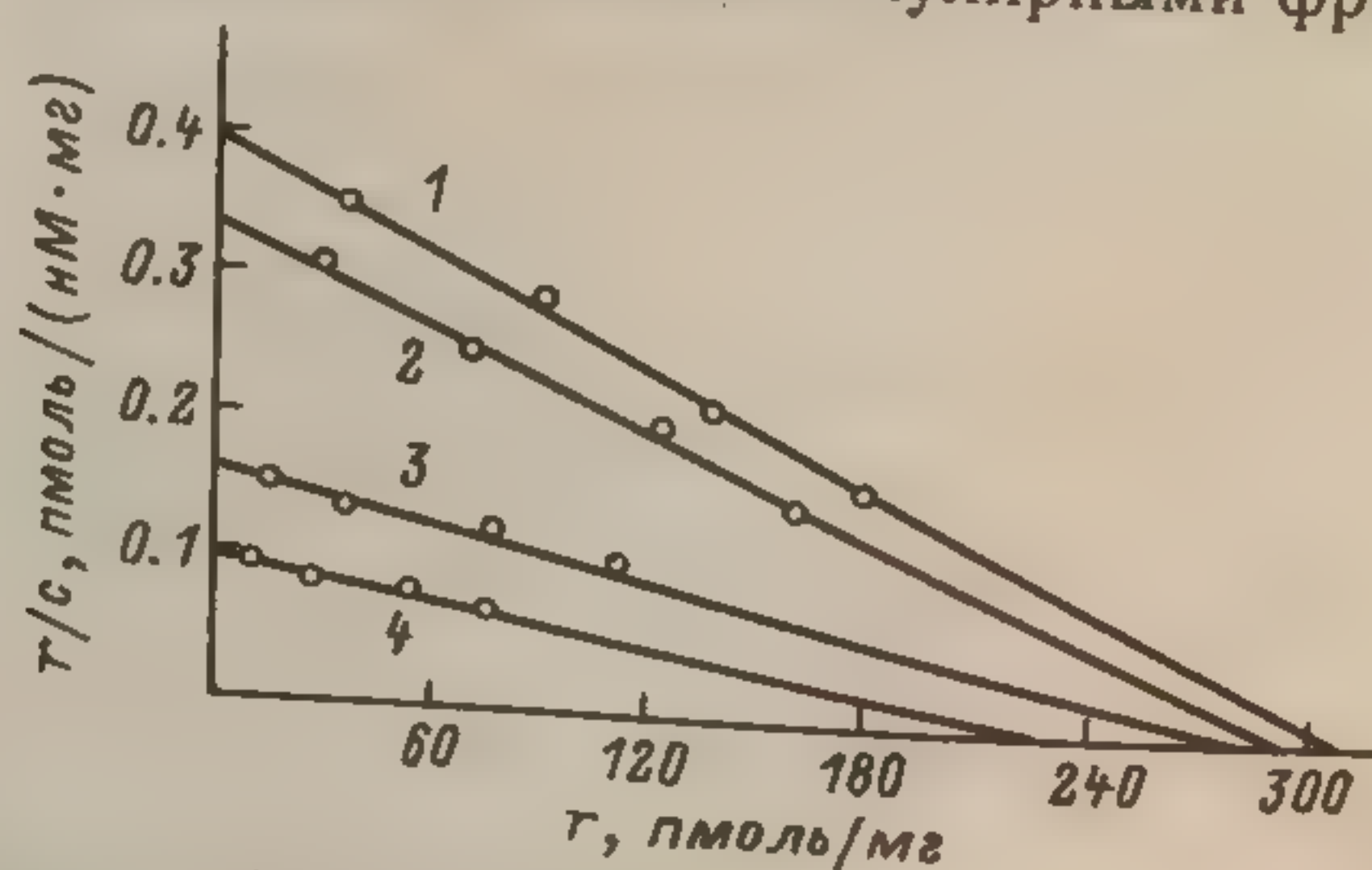


Рис. 17. Связывание $L\text{-}^3\text{H}$ -глутамата с очищенными фракциями глутаматсвязывающих мембранных белков (координаты Скэтчарда) в присутствии разных концентраций аргиопина.

2 — контроль; 2 — 0.5 мкг; 3 — 25 мкг; 4 — 50 мкг в инкубационной среде. Остальные обозначения, как на рис. 5, 6.

Выводы из результатов
из опыта 1-го опыта

Интактный яд
Аргиопин
Субфракции:
Арг-1
Арг-1-2
Арг-2-IV
Арг-2-V
Арг-2-VII
Арг-2-VIII

Арг-6
Арг-8
Арг-5

паука рецепторного связывания, что свидетельствует о том, что в составе яда паука имеются вещества, обладающие таким действием, которое может быть как ионофорным, так и рецепторным у насекомых.

Из приведенных данных видно, что наиболее эффективными являются фракции глутаматных рецепторов, что указывает на то, что в составе яда паука имеются вещества, обладающие таким действием, которое может быть как ионофорным, так и рецепторным у насекомых.

Поиск новых пептидов, обладающих функцией глутаматных рецепторов, может оказаться эффективным методом исследования функции глутаматных рецепторов. Поиски новых пептидов, обладающих функцией глутаматных рецепторов, могут оказаться эффективным методом исследования функции глутаматных рецепторов.

3.2. Химический синтез глутаматных рецепторов

Для описания строения глутаматных рецепторов необходимо знать химическую структуру рецептора.

Таблица 15

Влияние на рецепторное связывание L-³H-глутамата субфракций
яда паука *Argiope lobata*

Материал	Количество ■ пробе, мкг	Молекулярная масса, Да	Связывание, % от контроля
Интактный яд	10	500—500 000	60
Аргиопин	25	636	96
Субфракции:			
Arg-1	25		106
Arg-1-2	25	2000	2
Arg-2-IV	12.5		56
Arg-2-V	12.5	3000—4000	73
Arg-2-VII	12.5	Та же	71
Arg-2-VIII	12.5	»	73
Arg-6	12.5	»	69
Arg-8	12.5	»	68
Arg-5	12.5	»	101

паука рецепторного связывания L-³H-глутамата с синаптическими мембранами, что свидетельствует в пользу гипотезы о том, что в составе яда паука имеются фракции, обладающие полифункциональным действием, которые способны эффективно блокировать как ионофорную, так и связывающую функции глутаматных рецепторов у насекомых.

Из приведенных данных становится ясным, что в настоящее время наиболее эффективным природным блокатором ионофорной функции глутаматных рецепторов является аргиопин. Создается впечатление, что узнающие функции рецептора регулируются эндогенным ФИС, который обладает, как выяснилось впоследствии, противосудорожным действием (Беседин, 1987).

Поиск новых пептидных соединений, специфически ингибирующих функцию глутаматрецептивных синапсов головного мозга, может оказаться эффективным для создания нового класса антиэпилептических средств. Результаты наших исследований по конкурентному и неконкурентному ингибированию специфического связывания L-³H-глутамата с очищенными препаратами ГМБ позволяют отнести изолированные ГМБ мозга крыс к смешанному типу APV-квисквалатных рецепторов. Эти данные хорошо согласуются с фактами о широком распространении этих типов рецепторов глутамата в коре больших полушарий головного мозга крыс (Fagg, 1985).

3.2. Химический состав и кДНК, кодирующая синтез глутаматсвязывающих мембранных белков

Для описания структурной и пространственной организации глутаматных рецепторов головного мозга необходимо исследование химического состава компонентов, составляющих макромолекулу рецептора.

Необходимо отметить, что исследование химического состава очищенных препаратов ГМБ представляло собой не простую задачу: гидрофобные белки легко ассоциировали с образованием крупных конгломератов, обычно денатурировали при резком изменении температуры и рН буфера и оказались практически нерастворимыми после лиофилизации или замораживания—оттаивания. Для того чтобы избежать указанных трудностей, анализ выделенных фракций ГМБ проводили при $+4^{\circ}\text{C}$ в рабочих буферах, содержащих 0.01 М дезоксихолат натрия.

Гомогенность выделенных фракций ГМБ контролировали с помощью метода изоэлектрофокусирования, позволяющего увидеть незначительные примеси чужеродных компонентов. Как оказалось, низкомолекулярная фракция ГМБ содержала белковую полосу, соответствующую изоэлектрической точке рН 4.7.

Другим критерием гомогенности выделенного препарата ГМБ является определение N-концевой аминокислоты. Мы попытались определить ее с помощью дансилхлоридного метода по Грею и Хартли (Gray, Hartley, 1971). Исследование дансильных производных аминокислот методом тонкослойной хроматографии на полиамидных пластинах до и после гидролиза ГМБ обнаружило, что на N-концевом участке белка, по-видимому, находится тирозин. Полученные нами результаты подтвердили ранее описанные данные Михаэлиса и соавт. (Michaelis et al., 1981a).

В табл. 16 и 17 представлен химический состав: липиды и аминокислоты очищенных ГМБ (Дамбинова, Беседин, 1984). Среди идентифицированных липидов, экстрагируемых из гликопротеидлипидных комплексов рецептора, были обнаружены холестерин и фосфолипиды. Большинство фосфолипидов приходится на фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилхолин. Остальные липиды содержатся в незначительных количествах (см. табл. 16).

Следует отметить, что в состав очищенных препаратов ГМБ могут входить фракции пептидов, обладающих высоким сродством к глутаматному рецептору (Дамбинова и др., 1984a). Одна

Таблица 16

Химический состав синаптических мембран и солюбилизованного глутаматного рецептора

Фракции	Содержание липида, мг на 1 мг белка	Основные липиды	Соотношение фосфолипид/холестерин, моль/моль
Синаптические мембраны	1.2	Х, ФХ, ФС, ТГ, СФ	1.3
Солюбилизованный и очищенный глутаматный рецептор	0.9	ФЭ, ФХ, Х	1.7

Примечание. ФХ — фосфатидилхолин, ФЭ — фосфатидилэтаноламин, СФ — сфингмиелин, Х — холестерин, ТГ — триглицерин, ФС — фосфатидилсерин.

Аминокислотный состав выделенного из

Аминокислоты

Асп
Тре
Сер
Глу
Гли

Ала
Вал

из этих фракций глутамата с синаптической ГМБ, прошедшей через жидкостную фазу с белковой фазой промывки пр

Данные по составу, нами использованного рецепторного на сопоставлении с кислотных остатков

Впервые на кислотного состава. Согласно этой

обладает наибольшей конформации, глутаматных аминокислотных макромолекулы. Впоследствии это доведение миоглобина

предложен теория макромолекул пептидных (V) АО применен для анализа (Хромов-Борисов) Фишера для из

В табл. 17 приведен состав аминокислотных остатков АО и их массы

Таблица 17а

Аминокислотный состав очищенного глутаматсвязывающего белка, выделенного из синаптических мембран коры головного мозга крыс

Амино-кислоты	Число остатков на 1 остаток серина	Амино-кислоты	Число остатков на 1 остаток серина	Амино-кислоты	Число остатков на 1 остаток серина
Асп	3.8	Иле	5.8	Оксипролин	1.2
Тре	2.1	Лей	6.5	Тир	3.0
Сер	1.0	Фен	7.2	Три	6.0
Глу	4.3	Гис	2.8	Цис	1.2
Гли	4.5	Лиз	5.0	3-Метил-гистидин	2.1
Ала	4.4	Арг	1.2		
Вал	6.3	Про	1.3		

из этих фракций, специфически ингибирующая связывание L-глутамата с синаптическими мембранами, обнаруживалась в составе ГМБ, прошедшего все стадии очистки, включая высокоэффективную жидкостную хроматографию. Удаление «примесных» пептидов с белковой фракции требует специальных приемов осаждения и промывки препарата ГМБ.

Данные по определению аминокислотного состава ГМБ были нами использованы при расчете формы и конформации глутаматного рецептора (Дамбинова, Хромов-Борисов, 1983), основанного на сопоставлении объемов полярных и неполярных аминокислотных остатков.

Впервые наличие связи формы белковой глобулы от аминокислотного состава было предложено Ваугом (Vaugh, 1954). Согласно этой гипотезе, белковая глобула в водном окружении обладает наибольшей термодинамической стабильностью в такой конформации, при которой входящие в состав молекулы полярные аминокислотные остатки (АО) находятся на внешней поверхности макромолекулы, а неполярные АО — внутри белковой глобулы. Впоследствии это предположение было подтверждено при исследовании миоглобина (Kendrew, 1963) и фермента глутаматдегидрогеназы (Fisher, Gross, 1964a). На основании этого был предложен теоретический расчет формы и конформации белковых макромолекул путем сопоставления объемов полярных (V_e) и неполярных (V_p) АО (Fisher, 1964). Этот метод позднее был успешно применен для анализа структуры никотинового холинорецептора (Хромов-Борисов, 1975). Мы попытались использовать метод Фишера для изучения формы и пространственной организации глутаматных рецепторов ЦНС.

В табл. 17 представлены результаты определения аминокислотного состава ГМБ, разделенного на полярные и неполярные аминокислотные остатки (АО). Молекулярные объемы аминокислотных остатков ($V_{АО}$), суммарные значения объема полярных АО и их массы (соответственно V_e и M_e) и те же величины для

Аминокислотный состав глутаматсвязывающих мембранных белков, представленный на основе данных молекулярных объемов АО

Полярные аминокислоты						Неполярные аминокислоты					
Номенклатура	V_{AO} (теоретическое)	M_{AO}	Число АО	Суммарное значение		Номенклатура	V_{AO} (теоретическое)	M_{AO}	Число АО	Суммарное значение	
				V_e	M_e					V_i	M_i
Асп	66.7	115	3.8	253.5	437.0	Гли	36.1	57	4.5	162.5	256.5
Тре	69.7	101	2.1	146.4	212.1	Ала	53.2	71	4.4	234.1	312.4
Сер	53.4	87	1.0	53.4	87.0	Вал	83.9	99	6.3	528.6	623.7
Глу	83.0	129	4.3	358.6	554.7	Иле	100.1	113	5.8	580.6	655.4
Гис	19.9	137	2.8	55.7	383.6	Лей	100.1	113	6.5	650.7	734.5
Лиз	101.1	128	5.0	505.5	640.0	Фен	113.9	147	7.2	820.1	1058.4
Арг	104.1	156	1.2	124.8	187.2	Про	73.6	97	1.3	95.7	126.1
Тир	116.2	163	3.0	348.6	489.0	Окс-Про	77.0	113	1.2	92.4	135.6
Цис-Н	65.1	103	1.2	78.1	123.6	Три	136.7	186	6.0	820.2	1116.0
Мет-Гис	32.2	151	2.1	76.0	107.1						
В одной молекуле глутаматного рецептора	—	—	26.5	2000.6	3421.3	В одной молекуле глутаматного ре- цептора	—	—	43.2	3984.9	5018.6

[illegible]

неполярных АО (V_i и M_i) рассчитаны на 1 молекулу рецепторного белка.

Из приведенных в таблице данных следует, что молекула ГМБ состоит приблизительно из 70 АО, причем общий объем молекулы составляет около $60\,000\text{ нм}^3$. Масса молекулы, рассчитанная из суммы масс АО, равняется приблизительно 8440 Да, и вычисленная по Фишеру (Fisher, 1964) относительная полярность (отношение объемов полярных и неполярных АО) составляет 0.5.

Условно принимая, согласно Фишеру, форму молекулы ГМБ близкой к сферической, можно подсчитать, что радиус сферы молекулы равен 112 нм. Однако, по Фишеру, толщина внешнего (гидрофильного) слоя не превышает 40 нм, следовательно, радиус внутренней (гидрофобной) сферы будет равен приблизительно 72 нм, а ее объем составляет в данном случае $15\,630\text{ нм}^3$. Суммарный объем неполярных АО, равный $39\,850\text{ нм}^3$, значительно больше, чем вычисленный объем внутренней гидрофобной сферы. Вычисленный объем внешней гидрофильной зоны (из разности общего объема молекулы и гидрофобной зоны) приблизительно в 2 раза превышает суммарный объем полярных АО, обнаруженных в молекуле ГМБ. Отсюда следует вывод, что субъединица рецепторного белка не имеет сферической формы и часть гидрофобных аминокислот должна находиться во внешней зоне. Следовательно, олигомеризация макромолекулы ГМБ может происходить за счет гидрофобного взаимодействия этих неполярных АО с водной средой. Более того, олигомеризация ГМБ имеет, вероятно, также биологическую целесообразность: олигомер ГМБ (и других рецепторов тоже) приобретает кооперативный характер взаимодействия с нейромедиатором.

При сопоставлении данных, полученных аналогичным способом для никотиновых холинорецепторов (нХР) (Хромов-Борисов, 1975), можно сделать ряд интересных наблюдений, касающихся структурной организации этих хеморецепторных белков. Так, объем белковой глобулы нХР, вычисленный как сумма объемов полярных и неполярных АО, равен $296\,300\text{ нм}^3$, при этом радиус внутренней неполярной зоны составляет около 150 нм, а радиус всей молекулы 190 нм. Относительная полярность нХР колеблется в пределах 0.93—0.99. Значения сферического радиуса, вычисленные по формуле и найденные из экспериментальных данных, практически совпадают (1.02); следовательно, форма нХР близка к сферической.

Сравнение приведенных выше параметров для ГР и нХР приводит к следующим выводам: ГР и нХР представляют собой олигомеры, причем у ГР протомеры соединены друг с другом, по-видимому, гидрофобными связями, а у нХР — дисульфидными (Raftery et al., 1980). Расщепление олигомеров у ГР может быть осуществлено обработкой детергентами типа додецилсульфата натрия, в то время как у нХР — восстановителями типа дитиотреитола. У нХР на внешней стороне глобулы расположены преи-

мущественно полярные АО, а у ГР полярные и неполярные примерно в одинаковых количествах.

Кислотно-основной состав полярных АО у ГР и нХР различен: у ГР число основных АО (гис, метил-гис, арг, лиз) на 20 % больше, чем кислых (асп, глу, цис-н), тогда как у нХР основных АО на 60 % меньше, чем кислых. Таким образом, у ГР преобладают катионные заряды, а у нХР анионные. Эти данные хорошо согласуются с результатами определения изоэлектрической точки у этих мембранных белков, что несомненно имеет отношение к взаимодействию их с медиаторами: глутамат — анион, ацетилхолин — катион. Очевидно, первая ступень хеморецепции, сближение медиатора с рецептором, осуществляется в обоих случаях катион-анионными силами.

Для определения ориентировочной локализации ГМБ в синаптической мембране В. И. Бесединым (1987) были использованы формулы расчета дискриминантной функции Z (Barrantes, 1975). На основании этих расчетов оказалось, что ГМБ может быть отнесен к сильногидрофобным интегральным белкам, способным глубоко «утопать» в мембранном матриксе.

Изучение молекулярной и пространственной организации глутаматного рецептора на современном этапе невозможно без исследования последовательности аминокислот в белковой части рецептора. Поскольку анализ структуры ГМБ представляет собой не простую экспериментальную задачу и для ряда мембранных рецепторов она была решена только через установление нуклеотидной последовательности в геноме (Kobilka et al., 1987), то мы попытались выделить кДНК, кодирующую синтез глутаматных рецепторов. Поиск и выделение кДНК проводили с помощью иммунологического скрининга коммерческой кДНК-овой библиотеки мозга человека.* Отбор клонов, способных индуцировать синтез глутаматных рецепторов, осуществляли с использованием поли- и моноклональных антител (Дамбинова и др., 1987; Смирнова и др., 1988). В результате проведенного иммуноскрининга 10^6 клонов библиотеки кДНК мозга человека нами был выделен один клон рекомбинантного фага λ GBR, дающий положительный иммунологический сигнал. Анализ ДНК, выделенной из этого фага, обнаружил наличие «вставки» кДНК размером около 500 пар нуклеотидов, которая соответствует молекулярной массе субъединицы глутаматного рецептора — 14 кДа. Возможно, что длина выделенной последовательности кДНК сопоставима с длиной кодирующей части гена.

Для определения нуклеотидной последовательности кДНК были использованы клоны, полученные путем клонирования специфического Eco R 1 фрагмента кДНК, которые встраивали в составе векторов M 13 mp 10, M 13 mp 11, p \pm Z 18, pTZ 19. Была найдена

* Автор приносит глубокую благодарность зав. лаб. Р. Ш. Бибилашвили (ВКНЦ АМН СССР, Москва) за предоставление коммерческой библиотеки и обучение методам анализа.

открытая рамка трансляции для полипептида размером ■ 157 аминокислот с молекулярной массой 19 кДа. На основании анализа последовательности нуклеотидов можно заключить, что найденный кДНК составляет лишь небольшой фрагмент, возможно, узнающего участка глутаматного рецептора.

Клонирование последовательности кДНК не позволяет установить принадлежность ГМБ к одному из подтипов мембранных нейрорецепторов ВАК. Решить эту задачу нам позволило использование метода экспрессии мРНК, кодирующей синтез ГМБ ■ ооцитах *Xenopus laevis* (Saito, 1987; Schofield, 1987; Snutch, 1988). Выделенный нами кДНК-фрагмент был использован в качестве зонда для выделения специфичной поли(А)⁺ мРНК мозга человека. В результате проведенной блот-гибридизации обогащенной фракции мРНК с фрагментом кДНК был выделен препарат мРНК размером около 5.0 т. пар нуклеотидов, который имел комплементарную кДНК-фрагменту последовательность.

Указанная фракция мРНК была инъецирована ■ ооциты лягушки, и затем был измерен мембранный потенциал (МП) в присутствии L-глутамата и его аналогов. Полученные результаты позволяют утверждать, что выделенная нами фракция поли(А)⁺ мРНК способна кодировать синтез *de novo* глутаматных рецепторов, возможно, каинатного типа. Оказалось, что каинат вызывает стабильную деполяризацию мембраны ооцита, в то время как NMDA не вызывает изменение МП, а глутамат лишь слабо индуцирует этот эффект, и активность последних не зависит от присутствия ■ среде действующих на NMDA тип ионов Mg^{++} и глицина (Asher et al., 1988). Таким образом, можно заключить, что фракция мРНК, комплементарная кДНК-фрагменту ГМБ, способна синтезировать либо только каинатный тип рецептора, либо она содержит компоненты, которые кодируют синтез других типов глутаматных рецепторов, не экспрессируемых в исследованных условиях эксперимента.

Установленная нами последовательность нуклеотидов кДНК-фрагмента ГМБ не имеет гомологичных последовательностей с известными структурами м- и н-холинорецепторов, ГАМК- и глициновых рецепторов. Для убедительного доказательства этого факта необходимо иметь данные о полной нуклеотидной последовательности полноразмерного гена глутаматного рецептора, а не его небольшого кДНК-фрагмента. Вместе с тем предварительный машинный поиск в банке известных последовательностей аминокислот, составляющих макромолекулы белков, не выявил наличия гомологичных полипептидов, сходных по составу с фрагментом ГМБ, который кодируется кДНК. Возможно, это свидетельствует об уникальности генов глутаматных рецепторов, включая гены рецепторов каинатного типа.

Хотелось бы обратить внимание на тот факт, что полученные нами данные об экспрессии в ооцитах лягушки кДНК-фрагмента глутаматного рецептора каинатного типа оказались в некоторой

степени неожиданными. Как было показано выше, изолированные и мембраносвязанные ГМБ, выделенные из мозга крыс и человека, относятся к APV-квисквалатному типу. Внимательный анализ этих результатов и сопоставление их с литературными данными показал, что кажущегося противоречия между фактами, полученными с помощью биохимических и электрофизиологических подходов, не существует. Дело в том, что недавно (Honore et al., 1988) было показано, что глутаматные рецепторы каинатного и квисквалатного типа близки по своим свойствам и распространенности в структурах головного мозга. Даже полагают, что эти типы рецепторов являются разными конформационными состояниями одного типа глутаматных рецепторов, в то время как NMDA-рецепторы, по-видимому, принадлежат классу аспартатных рецепторов.

Возможность одновременного синтеза NMDA-рецепторов и каинатных, квисквалатных рецепторов в ооцитах лягушки продемонстрировал Кушнер и др. (Kushner et al., 1988). Они инъецировали тотальную мРНК, выделенную из головного мозга крыс, в ооциты лягушки и измерили функциональные характеристики вновь синтезированных макромолекул на мембране клетки. Были измерены ионные токи в ооците в присутствии фенциклидина, NMDA, APV и Mg^{2+} . Оказалось, что свойства NMDA-чувствительных ионных каналов, организованных на мембране ооцита, имеют лишь незначительные отличия от таковых, регистрируемых в нейронах головного мозга. Были представлены убедительные свидетельства в пользу того, что основные компоненты рецепторного комплекса синтезируются совместно, причем биосинтез их не зависит от клетки-носителя, типа мембраны, в которую они затем встраиваются.

Сопоставляя ранее полученные данные литературы с результатами работы, проведенной в нашей лаборатории Т. М. Смирновой, можно сделать предположение о наличии определенных взаимосвязей в механизмах экспрессии генов глутаматных рецепторов разных подтипов. Возможно, что гены NMDA-типа рецепторов экспрессируются отдельно и ГМБ кодируются специфическими фракциями мРНК.

Дальнейший анализ нуклеотидной последовательности и сопоставление его с данными N-концевой последовательности аминокислот может оказаться полезным для установления полной структуры глутаматного рецептора. Решение этих задач в ближайшей перспективе, а также установление полноразмерной геномной последовательности ДНК, кодирующей синтез ГМБ, позволит подойти к пониманию некоторых общетеоретических проблем хеморецепции, касающихся синтеза рецепторных белков, их встраивания в мембрану, эволюционного сходства с другими типами нейрорецепторов и других вопросов нейробиологии и медицины.

Эффективна
мер эпилепс
препаратов
шествуют д
торного связ
головного м
изолированны
нами были
выделения и
человека. Дл
отказаться от
вовала удале
рованию мем
эта стадия зам
объемом работ
понижения его
Степень чис
щихся на глута
Электрофорез в
что ГМБ, выд
молекулярные м
но превышает е
1987а). Данные
показали, что
по фракциям с
компонента с ма
ность предполож
ставлять собой
субъединиц с ма
Нами была пр
агрегированности
исходя из предп
молекулы рецепто
концентрации бел
(Думлер, Этингоф
Обнаружено, ч
исследовании мето
исском градиенте
использования кон
белка (рис. 18).
изучаемые препара
лические молекуляр
доказательством во
формы. При опреде
рецептора оказалось

3.3. Сравнительный анализ физико-химических свойств глутаматсвязывающих мембранных белков мозга крыс и человека

Эффективная диагностика заболеваний нервной системы, например эпилепсии, требует анализа свойств ГМБ, выделенных из препаратов головного мозга человека. Несмотря на то что существуют данные о сходстве основных характеристик рецепторного связывания L-³H-глутамата с СМ, выделенными из коры головного мозга крыс и человека, оказалось, что нативность изолированных ГМБ у человека была менее стабильной. Поэтому нами были разработаны дополнительные модификации метода выделения и очистки ГМБ из аутопсийного материала мозга человека. Для ускорения процесса выделения нам пришлось отказаться от процедуры гель-фильтрации, которая способствовала удалению избытка детергента и частичному фракционированию мембранных белков. В модифицированной методике эта стадия заменена на разбавление солюбилизатора десятикратным объемом рабочего буфера, не содержащего детергент, с целью понижения его концентрации с 1 % до 0.1 %.

Степень чистоты белковых фракций, специфически сорбирующихся на глутамат-сефарозе, контролировали разными методами. Электрофорез в нативных и денатурирующих условиях обнаружил, что ГМБ, выделенные из препаратов мозга человека, имеют молекулярные массы, близкие массам ГМБ крысы (14 и 60 кДа), но превышает ее примерно на 100—200 Да (Дамбинова и др., 1987а). Данные высокоэффективной жидкостной хроматографии показали, что субъединичный состав ГМБ человека сходен по фракциям с составом ГМБ крысы, в который входят три компонента с массой 14, 60 и 120 кДа. Эти данные дали возможность предположить, что ГМБ мозга человека могут также представлять собой олигомеры, состоящие из низкомолекулярных субъединиц с массой 14 кДа (Дамбинова, 1987б).

Нами была проведена попытка выявить различные состояния агрегированности этих глутаматсвязывающих рецепторных белков исходя из предположения, что изменение степени диссоциации молекулы рецептора может происходить при простом изменении концентрации белка, как это показано ранее для ферментов (Думлер, Этингоф, 1981).

Обнаружено, что положение основного пика рецептора при исследовании методом ультрацентрифугирования в изокинетическом градиенте сахарозы существенно отличалось в случае использования концентрированного и разбавленного препарата белка (рис. 18). Эти результаты свидетельствуют о том, что изучаемые препараты глутаматсвязывающих белков имеют различные молекулярные массы и являются экспериментальным доказательством возможности диссоциации рецептора на разные формы. При определении молекулярного веса этих двух форм рецептора оказалось, что диссоциированная форма мембранного

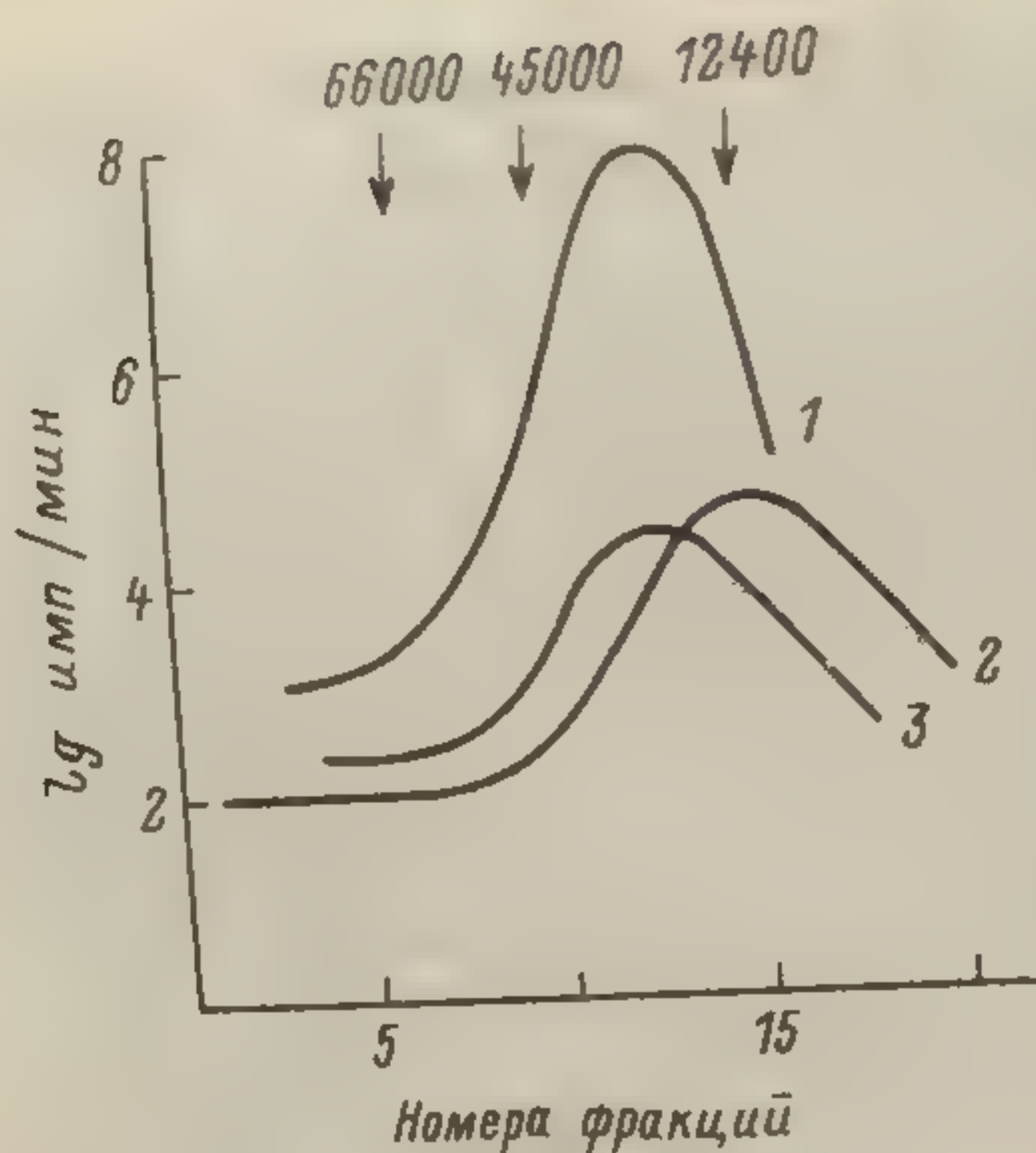


Рис. 18. Спектры распределения разных концентраций радиоактивно меченного глутаматсвязывающего мембранного белка в линейном градиенте сахарозы 5—20 %.

1 — глутаматсвязывающие мембранные белки (ГМБ) 1300 мкг/мл; 2 — ГМБ 6.5 мкг/мл; 3 — ГМБ 6.5 мкг/мл, но в присутствии L-глутамата (200 нМ). По оси абсцисс — номер фракции; по оси ординат — логарифмы величины радиоактивности (имп./мин). Стрелки — молекулярные массы белков-маркеров.

белка, специфически связывающего глутамат, соответствует зоне 12—15 кДа, в то время как ассоциированная форма этого белка обнаруживается в зоне 28—30 кДа (по маркерным белкам) (Дамбинова, Хромов-Борисов, 1983). Первое значение хорошо совпадает с данными электрофоретического анализа гомогенного препарата. Можно предположить, что мономерный компонент рецепторного белка имеет низкий молекулярный вес и эти компоненты могут ассоциировать, давая димер. Причем не исключено, что этот процесс является многоступенчатым и приводит к образованию еще больших агрегатов. Полученные данные совпадают с результатами, ранее обнаруженными при центрифугировании в градиенте глицерина общей фракции мембранных белков: основная зона распределения радиоактивного глутамата соответствует белковым компонентам с молекулярным весом от 12 до 60 кДа.

Гидродинамические параметры диссоциированной и ассоциированной форм рецепторного белка различались. Найдено, что при низких концентрациях очищенных мембранных белков расчетный коэффициент седиментации колеблется в пределах 2.1 S, тогда как для ассоциированных белков он соответствует 3.5 S. Интересно, что в присутствии немеченого L-глутамата при низких концентрациях коэффициент седиментации глутаматного рецептора соответствовал ассоциированной зоне мембранного белка. Наши данные согласуются с результатами, полученными Михаэлис и др. (Michaelis et al., 1981a), которые показали, что наибольшей глутаматсвязывающей активностью обладает белковый пик в зоне 3.5 S. Авторы предполагают, что в течение выделения и очистки происходит спонтанное снижение дисульфидных связей, ведущих к образованию субъединиц с M_r 13.8 кДа и коэффициентом седиментации 2.1 S. С нашей точки зрения, нельзя исключить возможность того, что макромолекула глутаматного рецептора состоит из не связанных дисульфидными мостиками диссоциированных компонентов, которые ассоциируются под действием нейромедиатора. В этом случае регуляция ионной проницаемости мембран

осуществляет физические мембрана и др. 19

В нашей укладка и конформации в биомембранах изменяется конформация под влиянием было проведение измерения спектров флуоресценции мембранных белков очищенных фракций. Параметры ГМБ. Полученные данные характеризуют взаимодействие глутамата с тирозином ГМБ с тирозином флуоресценции белков оказался существовал в ра и человека (рис. максимальной в том, что внутри субъединиц рецепторов в растворе от происхождения флуоресценции фракции ГМБ из

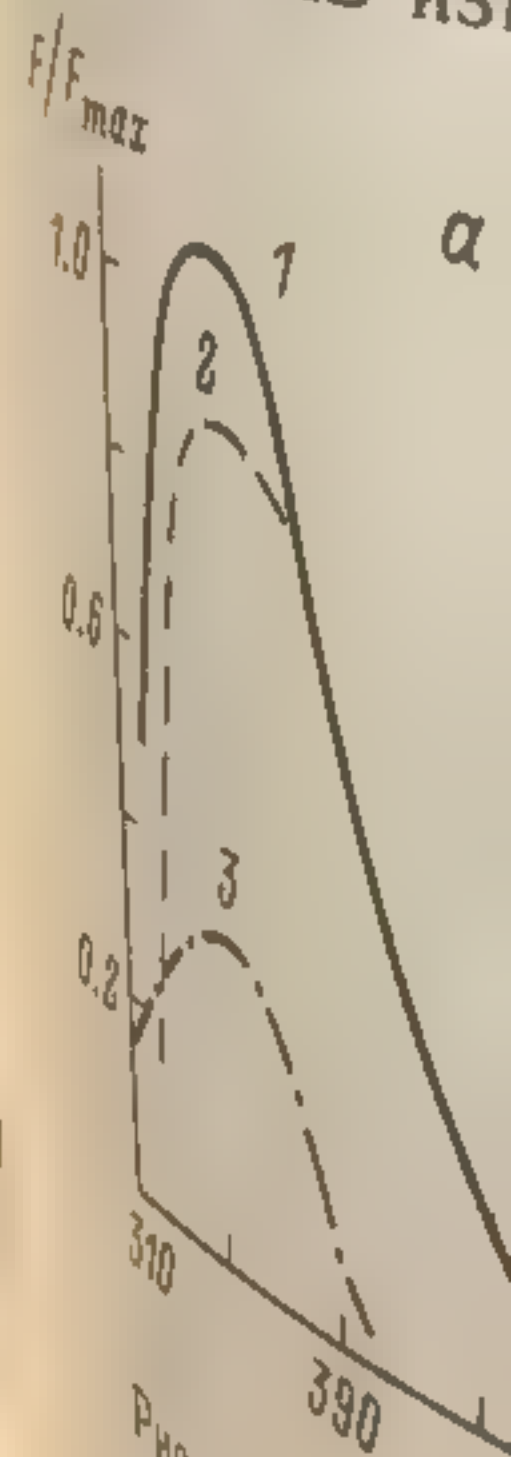


Рис. 19.

1 — спектры флуоресценции мембранных белков (4 M). 2 — флуоресценция мембранных белков (4 M) в присутствии глутамата. По оси абсцисс — длина волны (нм).

осуществляется за счет процессов ассоциации-диссоциации специфических мембранных белков под влиянием глутамата (Дамбинова и др., 1984б).

В нашей лаборатории были исследованы пространственная укладка и конформационные характеристики глутаматных рецепторов в биомембранах мозга крыс и человека. Были оценены изменения конформации ГМБ из разных объектов в очищенном виде под влиянием разных концентраций мочевины. Это исследование было проведено с помощью трех экспериментальных приемов: измерения спектров флуоресценции ГМБ в присутствии разных концентраций мочевины, определения температурной зависимости флуоресценции ГМБ и регистрации спектров кругового дихроизма очищенных фракций ГМБ. Оказалось, что физико-химические параметры ГМБ, выделенных из разных объектов, были сходными. Полученные данные подтверждают наличие олигомеризации в молекуле глутаматного рецептора. Спектры флуоресценции, характеризующие внутримолекулярный перенос энергии в молекуле ГМБ с тирозина на триптофан, показали, что вклад спектров флуоресценции тирозина в спектр собственной флуоресценции белков оказался максимальным в растворе 4 М мочевины и отсутствовал в растворах 2 М и 8 М мочевины для ГМБ крыс и человека (рис. 19, а, б). Флуоресценция триптофана была также максимальной в растворе 4 М мочевины. Это свидетельствует о том, что внутри молекулы происходит ассоциация-диссоциация субъединиц рецептора, связанная с конформационными перестройками в растворах мочевины разной концентрации независимо от происхождения белковой фракции.

Флуоресценцию меченной флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) фракции ГМБ измеряли в зависимости от температуры (рис. 20).

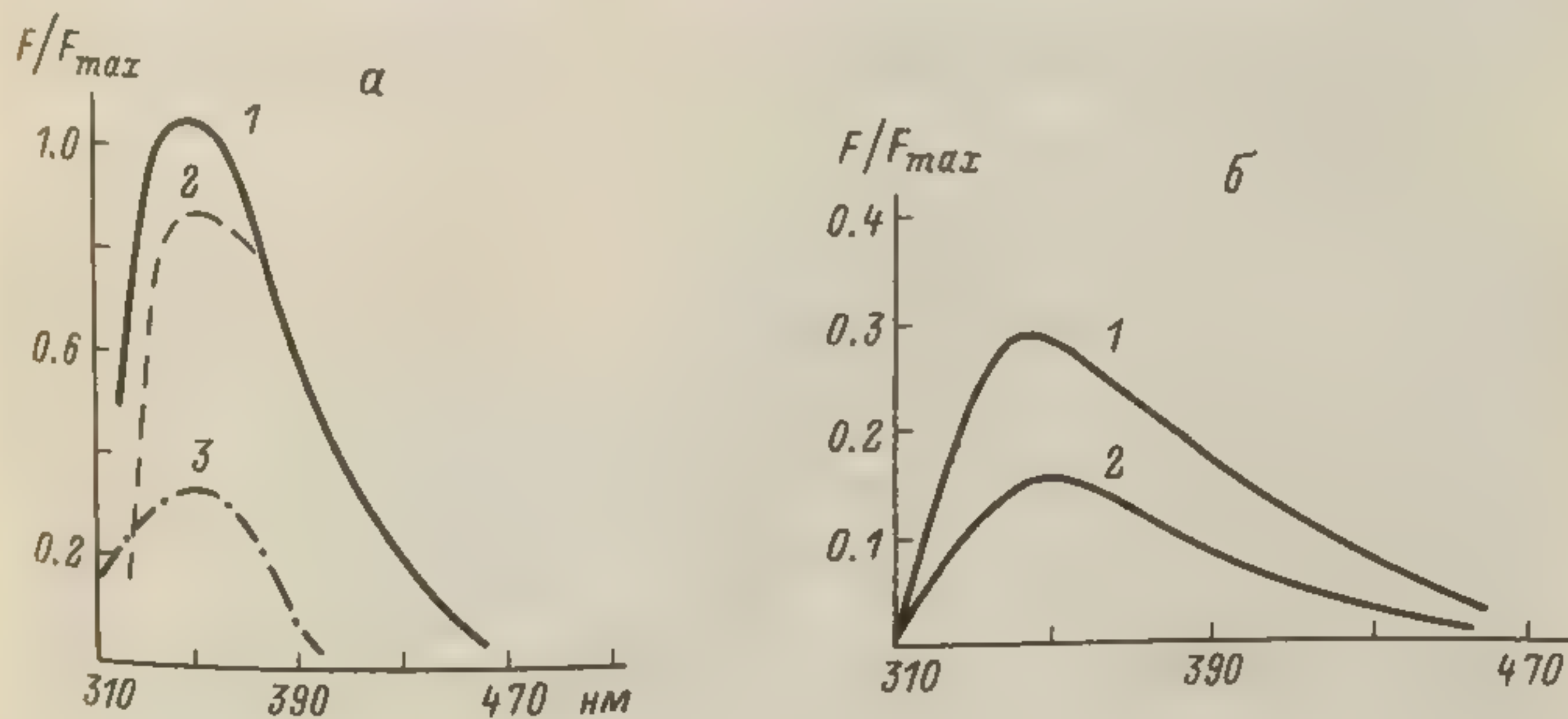


Рис. 19.

а — спектры флуоресценции глутаматсвязывающих мембранных белков (ГМБ) в растворе мочевины (4 М). 1 — флуоресценция тирозина и триптофана при длине волны $\lambda_{возб} = 275$ нм; 3 — флуоресценция тирозина по разности спектров. б — флуоресценция ГМБ в растворе мочевины 2 М (1) и 8 М (2). По оси абсцисс — длина волны (нм); по оси ординат — интенсивность флуоресценции.

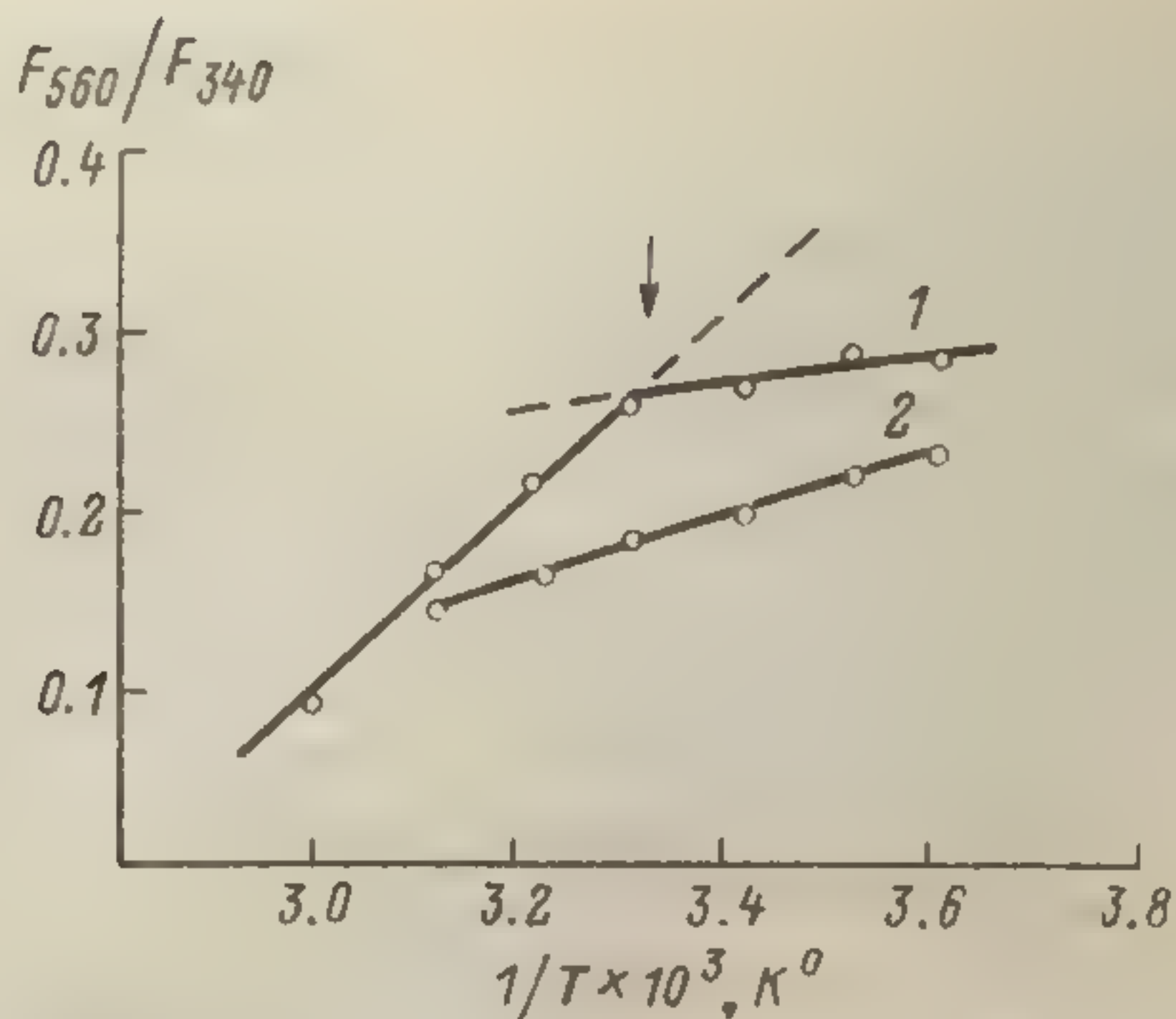


Рис. 20. Спектры флуоресценции флуоризотиоцианат-меченых глутаматсвязывающих мембранных белков (ГМБ) в разных растворах мочевины.

По оси абсцисс — $1/T, K^{-1}$; по оси ординат — относительная интенсивность флуоресценции. 1 — концентрация мочевины 2 М, 2 — концентрация мочевины 8 М. Стрелка — момент преломления спектра флуоресценции ГМБ в 2 М мочеvine.

При этом фракции FITC белков находились в разных растворах мочевины с концентрацией 2 М и 8 М. Флуоресценцию возбуждали при $\lambda=280$ нМ (триптофан), регистрацию производили при $\lambda=340$ и 560 нМ (т. е. длине волны, соответствующей излучению триптофана и FITC одновременно). Как показали результаты настоящего исследования, при нагревании образца до определенной температуры происходит излом кинетической кривой в координатах Аррениуса только для фракции белка, растворенного в 2 М мочеvine. Эти данные указывают на существование в растворе 2 М мочевины белковой структуры, обладающей упорядоченной степенью укладки.

Соотношение элементов вторичной структуры в молекуле солюбилизованного ГМБ рассчитывали по данным измерения спектров кругового дихроизма. Оказалось, что в 8 М мочеvine фракции ГМБ, выделенные как у крыс, так и человека, полностью денатурированы, в то время как в 2 М мочеvine (с поправкой на ароматические аминокислотные остатки белка) доля α - и β -конформации составляла 16 и 24 % соответственно. Следовательно, на основании этих результатов можно предположить, что во вторичной структуре ГМБ, выделенной из разных объектов, преобладают β -антипараллельные конформации пептидных цепей, причем 60 % белковой конформации составляют неупорядоченные структуры.

Для того чтобы выяснить вопрос, какова стехиометрия субъединиц рецептора в нативном состоянии, мы провели тщательный анализ фракций ГМБ с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Как для ГМБ мозга крыс, так и для ГМБ, изолированного из головного мозга человека, наблюдали спектр



Рис. 21. Спектры флуоресценции флуоризотиоцианат-меченых мембранных белков на колонках TSK= графин.

Стрелка — момент перемены элюирующей среды. По оси абсцисс — время.

белковых пиков компонентов разных молекулярных масс. Острые пики представляют собой субъединицы с массой, соответствующей молекулярной массе белка. Замена буфера с pH 7.4 на pH 10.0 приводила к увеличению интенсивности пиков. Это свидетельствует о том, что ГМБ, состоящий из легко агрегирующих гидрофобных субъединиц, в нативном состоянии находится в состоянии агрегации. Анализ ГМБ, выделенного из головного мозга крыс, показал, что в нативном состоянии ГМБ человека были

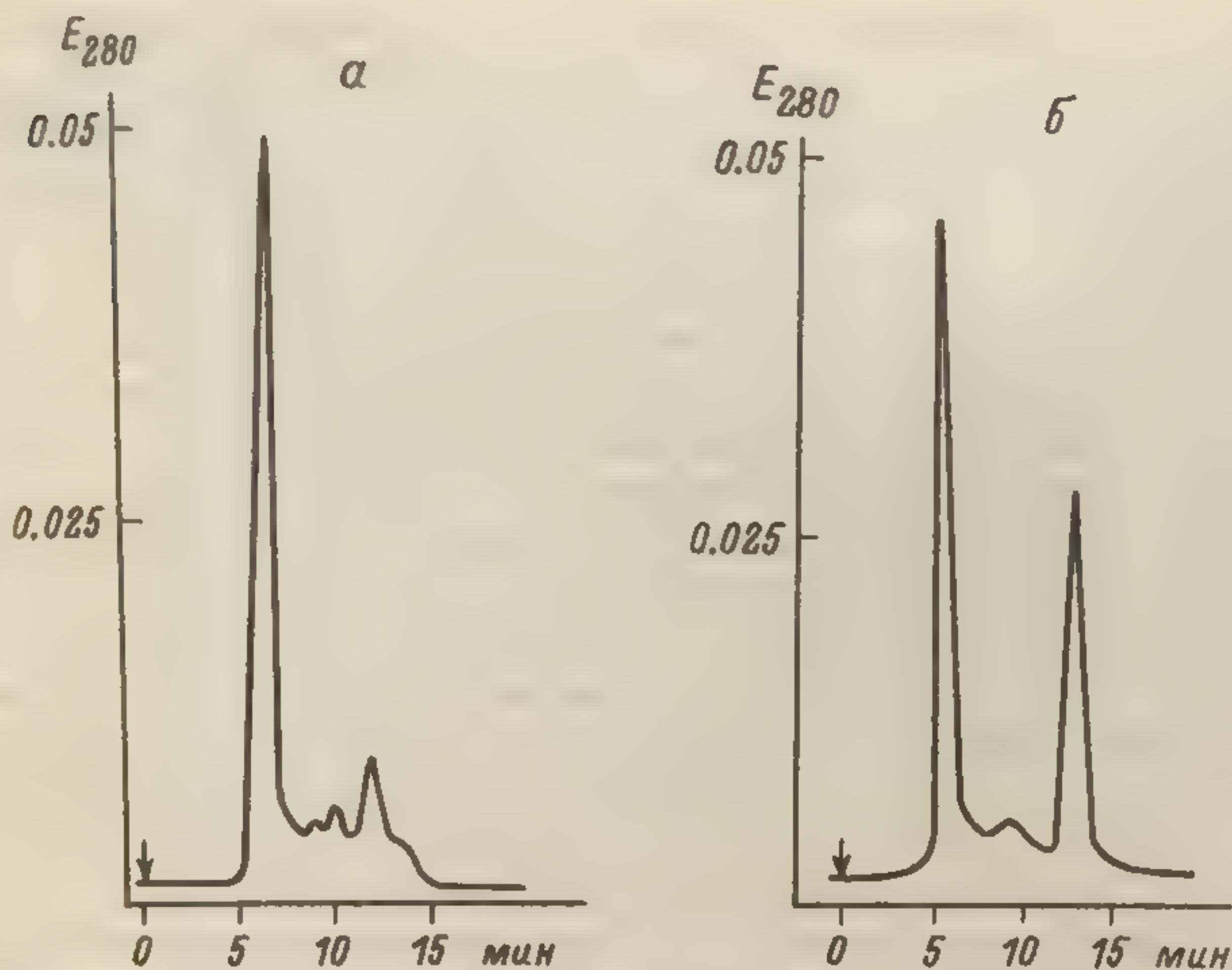


Рис. 21. Спектры хроматографического разделения препаратов глутаматсвязывающих мембранных белков, выделенных из головного мозга крыс ■ человека, на колонках TSK=3000 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Стрелка — момент нанесения образца: а — при повторной гель-фильтрации, б — при смене элюирующего фосфатного буфера (0.01 М) на трис-НСI (0.05 М, рН 7.4). По оси абсцисс — время (мин), по оси ординат — величина экстинкции при 280 нм.

белковых пиков на хроматограмме, состоящей из нескольких компонентов разной молекулярной массы. Определение молекулярной массы основных пиков свидетельствует о том, что они представляют собой агрегаты, состоящие из низкомолекулярных субъединиц с массой 14 кДа. Кроме того, было обнаружено, что каждый из выделенных пиков при повторной гельфильтрации снова давал спектр белковых пиков, аналогичных исходному (рис. 21,а). Замена буфера элюции (0.01 М фосфатного, рН 7.4) на буфер с более высокой ионной силой (0.05 М Трис · НСI рН 7.4) приводила к снижению уровня высокомолекулярной компоненты и увеличению компоненты с массой 14 кДа (рис. 21,б). Это обстоятельство объясняется, по-видимому, свойствами ГМБ, состоящих преимущественно из гидрофобных аминокислот и легко агрегирующих в олигомерный комплекс за счет образования гидрофобных связей.

Анализ ГМБ, выделенных из мозга человека, выявил некоторые особенности в формировании ассоциированных комплексов. Так, обработка сильными детергентами (например, SDS) не приводила к полной диссоциации компоненты ГМБ с массой 56—60 кДа в отличие от ГМБ мозга крысы. Эта фракция не изменялась и при смене буферов с разной ионной силой. Все остальные компоненты ГМБ человека были одинаковы по своим физико-химическим

свойствам с белковыми фракциями, изолированными из коры головного мозга крыс. Оказалось, что ГМБ человека давали агрегаты с массой, кратной 14 кДа, однако стехиометрия их высокомолекулярных фракций отличалась от ГМБ мозга крыс, что свидетельствует о более сложной организации глутаматных рецепторов головного мозга человека. Кажется вполне допустимым, что олигомеры глутаматного рецептора на синаптических мембранах присутствуют преимущественно в виде тетрамеров, которые являются наиболее устойчивыми в физиологических условиях функционирования хеморецептора.

Для оценки возможного расположения ГМБ в мембранном матриксе мы сопоставили данные относительно толщины синаптической мембраны и радиуса Стокса для рецепторного белка. Радиус Стокса был рассчитан с учетом данных гель-проникающей высокоэффективной хроматографии по отношению к белкам-маркерам с известным радиусом. Оказалось, что мономер ГМБ с $M_r = 14$ кДа имеет радиус Стокса около 17.0 нм, в то время как тетрамер с M_r 56 кДа имел радиус Стокса порядка 30.0 нм.

Таким образом, на основании вышеизложенных данных можно представить, что хеморецепторный мембранный белок, специфически связывающий глутамат, независимо от источника выделения является гликопротеин-липидным комплексом, состоящим из низкомолекулярных субъединиц, способных к ассоциации-диссоциации в зависимости от присутствия нейромедиатора. Создается впечатление, что минимальная структурная единица рецептора может состоять из четырех субъединиц, которые, находясь в определенной стехиометрии, составляют олигомерную макромолекулу рецепторного мембранного белка.

3.4. Иммунохимическая идентификация глутаматных рецепторов в головном мозгу

В последние годы исследователи возлагают особые надежды на иммунохимические способы идентификации структурных компонентов мембран. Высокая специфичность иммунных антител и их способность узнавать разные антигенные детерминанты рецепторов широко используются для изучения топографии рецепторов на мембране нервной клетки, особенностей структуры их активного центра, механизмов генетической регуляции синтеза этих белков. Например, изучение субъединиц холинорецептора с помощью моноклональных антител (МКАТ) выявило наличие выраженной гомологии между субъединицами рецепторного комплекса. С другой стороны, была обнаружена идентичность ГАМК и глициновых рецепторов, имеющих гомологичные последовательности, которые узнавались МКАТ и были сопряжены с каналами для ионов Cl^- по однотипному механизму (Betz et al., 1986).

В настоящее время данные об иммунохимических свойствах глутаматных рецепторов ЦНС практически отсутствуют, за исклю-

чением наших работ Michaelis, 1984). Идентификация ГМБ способствовала к ГМБ способностям (Michaelis et al., 1984) структуры глутаматных рецепторов (МКАТ), которые позволяют при работе с клетками. Получение клонированных иммунизированных в культуре миеломных глобулинов, позволило получить антитела, идентичные в количествах (Köhler, 1984) получать МКАТ детерминантам сложным белкам, исключительное качество маркеров (свойства).
В результате экспериментов охарактеризованы гибридомы, секретирующие иммуноглобулины (рис. 23). Был создан банк данных, в которых мы руководство

Мышьяк
миелома
PX63-Ag-8-
653

НАТ-среда
(на фидерном
слое)

Клонирование
Скрининг
специфичности

Рис. 22. Схема получения моноклональных антител

чением наших работ и работ группы Михаэлис и сотр. (Roy, Michaelis, 1984). Последние показали, что поликлональные антитела к ГМБ способны блокировать функцию глутаматных рецепторов (Michaelis et al., 1986). Вместе с тем для выяснения особенностей структуры глутаматного рецептора требуется получение МКАТ, которые позволяют избежать ряд трудностей, возникающих при работе с поликлональными моноспецифическими антителами. Получение клеточных гибридов путем слияния лимфоцитов иммунизированных животных с неограниченно растущими в культуре миеломными клетками, не продуцирующими иммуноглобулинов, позволило и настоящее время синтезировать нужные антитела, идентичные по своей специфичности и препаративных количествах (Köhler, Milstein, 1985). Гибридомы дали возможность получать МКАТ (см. рис. 22) к индивидуальным антигенным детерминантам сложных антигенов (Köhler, 1981). Поэтому появились исключительно широкие возможности их использования и качестве маркеров (Фукс и др., 1982).

В результате экспериментальной работы нами были получены и охарактеризованы гибридные клетки, способные стабильно секретировать иммуноглобулины, специфически связывающие ГМБ (рис. 23). Был создан банк клонов гибридных клеток, при отборе которых мы руководствовались следующими критериями: реактив-

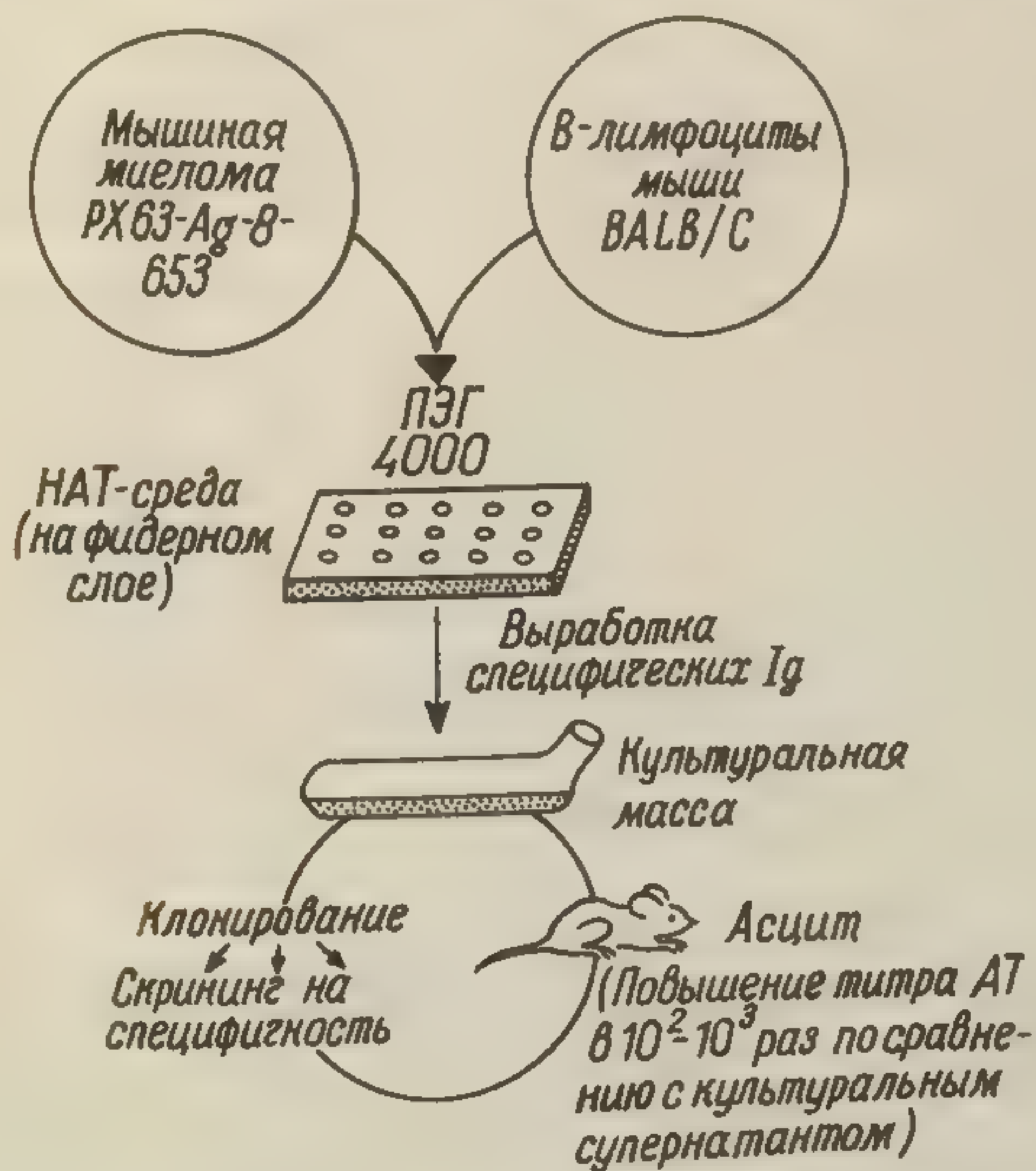


Рис. 22. Схема получения моноклональных антител (по: Фукс и др., 1982).
Объяснения в тексте.

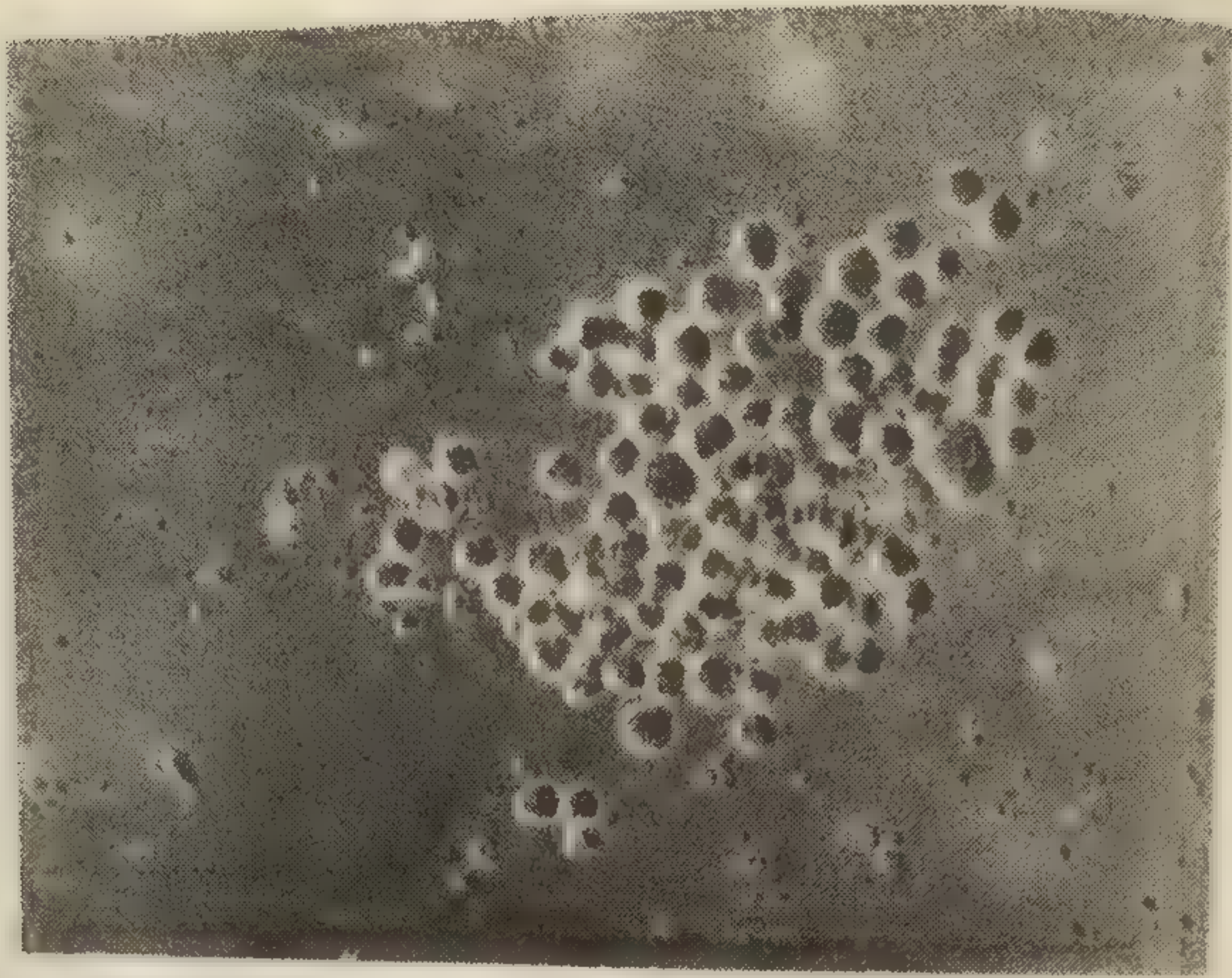


Рис. 23. Клон гибридных клеток, продуцирующих моноклональные антитела к глутаматсвязывающему мембранному белку. Клон получен путем слияния иммунных спленоцитов с миеломными клетками в культуре (по: Дамбинова и др., 1987б).

ностью продуцируемых ими антител к ГМБ разного происхождения, фенотипической стабильностью линий гибридных клеток, классом иммуноглобулинов, вырабатываемых этими клетками, количеством МКАТ в асцитных жидкостях мышей, несущих гибридому (Дамбинова и др., 1987а).

При получении больших количеств МКАТ мы использовали метод выделения МКАТ из асцитной жидкости мышей линии ВА LB/C, что позволило существенно повысить выход специфических антител по сравнению с их выходом при культивировании *in vitro*. На первой стадии очистки иммуноглобулинов из асцитной жидкости в культуральной среде гибридных клеток мы использовали два способа: высаливание с помощью 2.53 М раствора сульфата натрия или аффинную хроматографию на сефарозе с иммобилизованным белком А, который специфически связывает иммуноглобулины класса IgG. Мы не нашли каких-либо различий в составе или свойствах иммуноглобулинов, полученных этими разными способами, что свидетельствует о принадлежности изучаемых МКАТ к классу IgG.

Дополнительную очистку МКАТ проводили с помощью аффинной хроматографии на сефарозе с иммобилизованным ГМБ. Полученные фракции МКАТ исследовали на сродство к ГМБ методом твердофазного иммуноферментного анализа. Под термином «сродство» мы определяли степень потенциальной связи между антигеном и антителом, выражаемую величиной K_d . Эта величина характеризует меру концентрации антител, требующихся для 50%-ного насыщения антигена.

Как видно не позволила что, однако, м титре получен сродства очи предполагается с антигенными

По данным из головного м что кинетика в позволяющей п станты K_d . Одна выявил зависи о наличии полиг теном, либо о в реакций. Анализ привел нас к вые участке связыва кривой в област высокой констант отности к неспеци

Для выяснени детерминант в ГМ использованы мон ческих маркеров г.

Изучение сродства МКА

№	Антиген	Концен МК м
1		
2	1	10
1		
2	»	5
1		
2	»	1
1		
2	»	
1		
2	»	
1		
2	»	
1		
2	»	

Примечание: 1 — антиген, 2 — антитело, 10 — концентрация антигена, 5 — концентрация антитела, 1 — концентрация антигена, 0.5 — концентрация антитела

Как видно из табл. 18, чувствительность используемого метода не позволила нам использовать разведения антител выше 1 : 200, что, однако, может свидетельствовать и о сравнительно невысоком титре полученных МКАТ. Вместе с тем оказалось, что степень сродства очищенных МКАТ к антигену достаточно высока. Это предполагает наличие высокоспецифичного взаимодействия МКАТ с антигенными детерминантами рецепторного белка.

По данным взаимодействия МКАТ и очищенных фракций ГМБ из головного мозга человека (Дамбинова и др., 1987б) оказалось, что кинетика взаимодействия имеет форму кривой насыщения, позволяющей построить графики Скэтчарда для определения константы K_d . Однако анализ результатов в координатах Скэтчарда выявил зависимость, которая может свидетельствовать либо о наличии поливалентных взаимодействий между МКАТ и антигеном, либо о возможном появлении в системе неспецифических реакций. Анализ данных литературы и собственных результатов привел нас к выводу о том, что МКАТ реагирует с ГМБ в одном участке связывания, имеющем K_d порядка 100 нМ. Поведение кривой в области насыщения, которое характеризуется очень высокой константой K_d порядка 1—5 мкМ, по-видимому, можно отнести к неспецифическим взаимодействиям МКАТ.

Для выяснения вопроса о существовании общих антигенных детерминант в ГМБ, выделенных из разных объектов, нами были использованы моноклональные антитела в качестве иммунохимических маркеров глутаматузнающего центра рецептора. Монокло-

Т а б л и ц а 18

Изучение сродства МКАТ к ГМБ, изолированных из мозга крыс и человека

№	Антиген	Концентрация МКАТ, мкг	Разведение	ОП ₄₉₂	
				IgG (A)	IgG (KC)
1	1	100	0	1.50	0.50
2				0.50	0.4
1	»	50	1 : 2	1.28	0.43
2				0.41	—
1	»	10	1 : 10	0.61	0.28
2				0.28	0.23
1	»	5	1 : 20	0.42	0.19
2				0.16	0.18
1	»	2	1 : 50	0.22	0.10
2				0.12	0.14
1	»	1	1 : 100	0.16	0.11
2				0.10	0.10
1	»	0.5	1 : 200	0.10	—
2				0.12	—

Примечание. 1 — ГМБ, изолированные из мозга крысы; 2 — ГМБ, изолированные из мозга человека; IgG_(A) — иммуноглобулины из асцита; IgG_(KC) — иммуноглобулины из культуральной среды; ОП — оптическая плотность при $\lambda=492$ нм.

Влияние МКАТ и ГМБ на связывание L-³H-глутамата

Вид мембран	Доза МКАТ, мкг	Подавление связывания, %	IC ₅₀ , * моль/л
Синаптические мембраны, выделенные из головного мозга крыс	10 мкг	66	10 ⁻⁷
Контроль (к интерферону)	20 мкг	46	10 ⁻⁶
Синаптические мембраны, выделенные из посмертных препаратов головного мозга человека	10 мкг	82	5 · 10 ⁻⁸

* IC₅₀ считали из оценки молекулярной массы МКАТ 2 · 10⁵ Да.

нальные антитела (МКАТ) обладали способностью конкурировать за участки связывания нейромедиатора на синаптических мембранах и эффективно ингибировали специфическое связывание (табл. 19). МКАТ, полученные для ГМБ из мозга крысы, оказались эффективными также и для синаптических мембран, выделенных из головного мозга человека. Следовательно, поскольку МКАТ конкурировали с радиоактивным глутаматом за участки связывания, был сделан вывод о том, что активные центры глутаматного рецептора у крыс и человека имеют общие антигенные детерминанты.

Кроме того, МКАТ эффективно связывались и с очищенными ГМБ из мозга человека (рис. 24). Это позволило нам провести исследование иммунореактивности каждой из компонент ГМБ из мозга человека. При этом все они обнаружили сходные свойства. Как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные компоненты связывали МКАТ при иммуноферментном методе анализа. На рис. 24 представлены данные биологической активности фракций ГМБ, выделенных из мозга человека, которую определяли с помощью МКАТ, полученных к ГМБ крыс. Такие данные позволяют предположить, что в состав высокомолекулярных фракций ГМБ входят субъединицы с молекулярной массой 14 кДа. В то же время данные о том, что каждая из выделенных компонент ГМБ снова образует спектр белковых фракций, говорят о гомогенности высокомолекулярных конгломератов. Однако ни нативный, ни денатурирующий электрофорез не выявили фракцию белка с молекулярной массой выше 60 кДа. Это дает возможность предположить, что присутствие высокомолекулярных фракций в буферном растворе является следствием ассоциации белковых субъединиц за счет гидрофобных взаимодействий.

Сравнительный анализ степени сродства МКАТ и ГМБ мозга крыс и человека выявил интересную зависимость. Величины K_d для мозга крысы и человека мало отличаются между собой. Однако оказалось, что эти величины различаются для МКАТ, выделенных из культуральной среды гибридных клеток и асцитной жидкости. Причем в первом случае K_d для МКАТ из культуральной среды

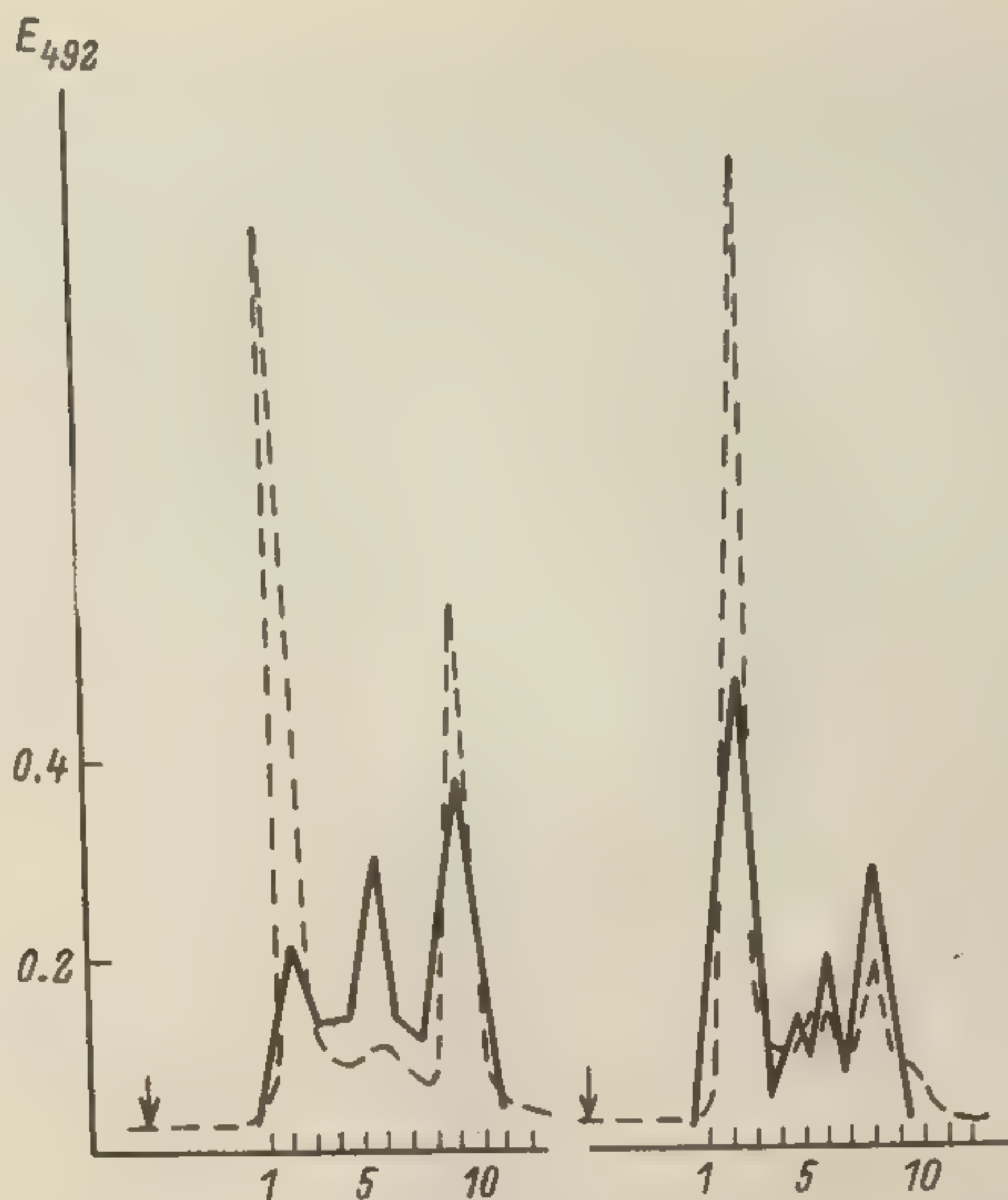


Рис. 24. Связывание моноклональных антител к глутаматсвязывающим мембранным белкам с фракциями очищенных белков (ГМБ), выделенных на колонках TSK=3000 с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Штриховая линия — профили элюции белковых фракций; сплошная линия — биологическая активность ГМБ (определена методом иммуноферментного анализа с применением моноклональных антител к ГМБ мозга крыс). По оси абсцисс — камера фракций; по оси ординат — величина экстинкции при 432 нм. Стрелка — нанесение образца.

составляет 160—200 нМ, а для МКАТ из асцита 70—100 нМ. Полученные данные свидетельствуют, что в асцитной жидкости синтезируются антитела не только с более высоким титром, но и более специфичные к общим антигенным детерминантам ГМБ, которые были выделены из разных объектов.

Нами было показано, что общие антигенные детерминанты, которые связывают МКАТ, находятся в активном центре глутаматного рецептора (Дамбинова и др., 19876). Эти данные были получены при исследовании конкурентного связывания МКАТ за связывание с «узкими» участками глутаматсвязывающих мембран. Как выяснилось, степень ингибирования специфического связывания ^3H -глутамата зависела не только от количества антител в среде, но и от длительности инкубации их с мембранами. Так, количество МКАТ, вызывающее 50%-ное ингибирование глутаматсвязывающей активности, резко уменьшается с увеличением времени инкубации, что предполагает возможное снижение доступа нейромедиатора к активному центру рецептора.

Немаловажный интерес представляют данные об иммунологической специфичности МКАТ к ГМБ мозга крыс. С этой целью

нами была исследована реактивность МКАТ к ГМБ, выделенным из разных объектов: клеток нейробластомы, клеток мозга человека и крыс. Результаты иммуноблотинга МКАТ и ГМБ, выделенных из головного мозга крыс и человека, подтвердили, что МКАТ к ГМБ мозга крысы способны «узнавать» глутаматные рецепторы, выделенные из клеток нейробластомы и клеток мозга человека. Это свидетельствует о межвидовой органной иммунологической специфичности глутаматных рецепторов. Этот вывод подтверждался тем, что исследованные МКАТ не взаимодействовали с мембранами и солюбилизованными белками, выделенными из плазматических мембран клеток печени, а также не влияли на ингибирование активности глутаматдекарбоксилазы (ГДК). Очевидно, узнающие участки молекулы ГДК-фермента, утилизирующего L-глутамат, и связывающие центры глутаматных рецепторов существенно различаются между собой по специфичности к аминокислоте и топографии активных центров.

Эти данные подтвердились и при иммуноморфологическом исследовании тонких срезов головного мозга крыс: коры больших полушарий, гиппокампа и полосатого тела. Оказалось, что МКАТ специфично сорбировались только на мембранах нейронов, ■ то время как ■ контрольных экспериментах при окрашивании тонких срезов сердца, печени и почек крыс они не оказывали влияния (рис. 25). Моноклональные антитела, полученные к ГМБ, реагировали избирательно со срезами структур мозга, и среди

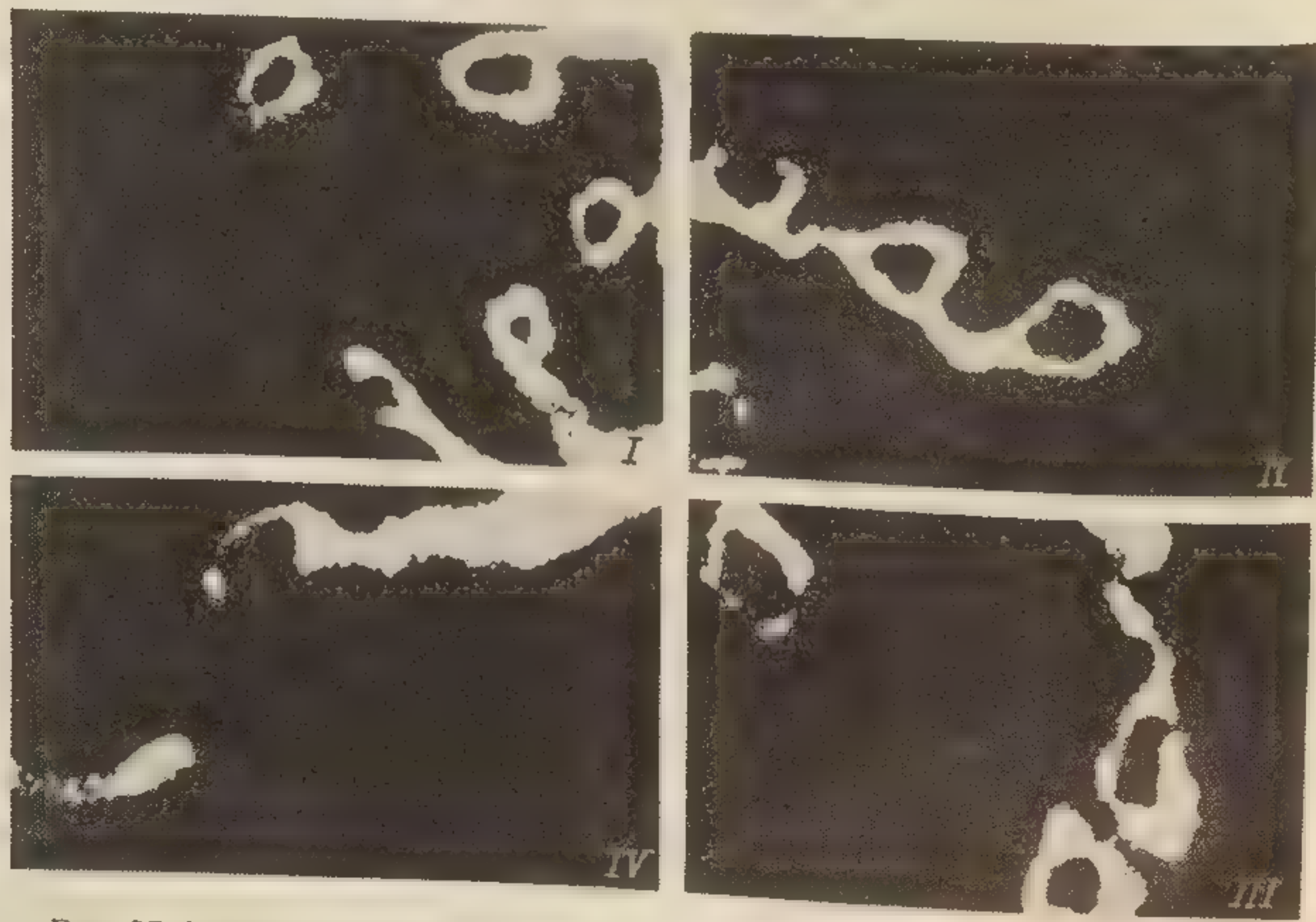


Рис. 25. Микрофотография распределения флуоризотиоцианат-меченых моноклональных антител к глутаматсвязывающим мембранным белкам на срезах головного мозга крыс.

I — кора больших полушарий; II — гиппокамп; III — полосатое тело; IV — мозжечок.

всего пула н
шало 30 %.

Наибольш
вала МКАТ,
покампе и по
дают гипотезу
путей, обнаруж
в головном мо

Следует под
с мембранами
полярных нейр
исследованных
цитоплазматиче
нейронов. Распо
рии нейронов, а
дает наши данн
ственно в нейро
полученные данн
раты ГМБ из голо
к физиологически
чувствительным к

Детальный ан
с белком обнаруж
условиях способно
вестные агонисты,
идентичности выде
в качестве субъеди
ным, рецепторный с
из низкомолекуляр
что хорошо соглас
данными об олиго
ЦНС.

Определение не
степени упорядоченн
и диссоциации в ра
гидродинамические
в настоящем исс
структурных особе
этого белка. Вполн
рецептора на мемб
блоков гликопроте
ней поверхности
фобных аминокисл
В соответствии
представить, что гл
это имеет место у
с вытянутый эллип
небольшим участко
способен сформ

к ГМБ, выделяемых из
деток мозга человека
и ГМБ, выделяемых из
вердили, что эти
тамматные рецепторы
деток мозга человека
й иммунологическими
от вывод подтверждающих
модействовали с мо-
выделенными из про-
не влияли на ингиби-
ы (ГДК). Очевидно,
, утилизирующего
ых рецепторов суще-
цифичности к аминам

не влияли на ингиби-
торы (ГДК). Очевидно,
утилизировать рецепторов су-
ществительности к значе-
нию морфологическо-
го крыс: коры больше.
Оказалось, что МКА.
мембранах нейронах
при окрашивании
ни не оказывали влия-
ния полученные к ГМБ
структур мозга, и сред-

изотиоцианат-меченых молекул белкам на срезах тела. IV — мономер

изотопицианат-меченных молекул
ным белкам на срезах геля
полосатое тело; IV — возможное

101

100

порта ионов Na^+ . В этом случае «пора» ионного канала может оказаться более ассоциированным участком, чем узнающий центр макромолекулы рецептора.

Теоретические расчеты, проведенные на основании наших результатов и данных литературы, касающихся организации хемовозбудимых каналов для ацетилхолина, свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что ионный канал, управляемый L-глутаматом, представляет собой воронкообразный вход для гидратированных ионов Na^+ . Узкая часть канала содержит полярные группы и, по-видимому, представляет селективный фильтр, в котором катион частично дегидратируется до максимального диаметра около 6.4 нм. Факты, касающиеся конкурентного и неконкурентного ингибирования рецепторного связывания L- ^3H -глутамата в присутствии ФИС и аргиопина, подтверждают такое строение макромолекулы глутаматного рецептора. Очевидно, аргиопин — блокатор ионофорной функции — проходит внутрь гидрофобного канала, связываясь необратимо с локусами, ответственными за избирательный транспорт катионов, в то время как ФИС локализован на поверхности рецепторного комплекса и конкурирует за узнающие центры L-глутамата. Анализ радиуса Стокса, расчеты формы ГМБ позволяют предположить, что белковые субъединицы тетрамера не пронизывают полностью мембрану с образованием трансмембранной интегральной структуры. Можно предположить, что для выполнения ионофорной функции рецептора необходим еще один белковый компонент, способный формировать ионный канал для катионов. Дальнейшее изучение ГМБ с помощью нейротоксинов позволит уточнить этот важный вопрос о молекулярной организации рецептора. Результаты, полученные нами, свидетельствуют о том, что моноклональные антитела, полученные к ГМБ мозга крыс, являются высокоизбирательными маркерами глутаматсвязывающих участков глутаматных рецепторов и способны избирательно и обратимо изменять функцию ответов нейронов на аппликацию L-глутамата. МКАТ к низкомолекулярным субъединицам ГМБ обнаружили высокую специфичность к определенным антигенным детерминантам глутаматных рецепторов, позволили выявить участки рецепторного комплекса, ответственные за связывание с нейромедиатором, а также участки, блокирующие функцию рецептора, что подтверждает предложенную нами гипотезу о наличии двух белковых компонентов в структуре рецепторов глутамата.

Оказалось, что в молекуле глутаматного рецептора имеется основная иммунологическая зона, к которой получается большинство (60—70 %) моноклональных антител. Эти зоны имеют высокую степень перекрестной иммунологической реакции между глутаматными рецепторами, выделенными из разных источников: головного мозга крыс, человека, клеток нейробластомы и нейронов моллюска. Как обнаружилось, большинство этих зон располагается на экстраклеточной поверхности (субъединицы) и ингибируется связывающие центры макромолекулы рецептора. Вместе с тем обнаружено, что МКАТ к глутаматным рецепторам имеют межви-

дую органическую
взаимодействием
происхождения
Перекрестные
таматы рецепторы
тверждают выдвигают
связывающие у
тивными в эволюции
минантами, сходными
щих, включая мутации
исследования «и
решения прикладные

довую органную иммунологическую специфичность, так как МКАТ взаимодействуют только с мембранами клеток нейронального происхождения.

Перекрестные реакции между МКАТ и ГМБ мозга крыс и глутаматными рецепторами, выделенными из разных объектов, подтверждают выдвинутое нами предположение о том, что глутаматсвязывающие участки рецептора являются наиболее консервативными в эволюции и обладают идентичными антигенными детерминантами, сходными у беспозвоночных и высших млекопитающих, включая мозг человека. Особенно важны эти данные для исследования «иммунохимической» анатомии мозга человека и решения прикладных задач нейробиологии.

РЕГУЛЯЦИЯ ИОНСЕЛЕКТИВНОЙ И ТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛАХ, ПРОТЕОЛИПОСОМАХ И ИНТАКТНЫХ НЕЙРОНАХ

4.1. Применение липосом и мембранных везикул для изучения функции рецепторных белков

Существующие гипотезы регуляции механизмов функционирования глутаматных рецепторов касаются преимущественно идеи, высказанной Кертисом и Уоткинсом (Curtis, Watkins, 1960), согласно которой L-глутамат избирательно управляет транспортом ионов через мембрану нейронов. Справедливость этой идеи была подтверждена разнообразными электрофизиологическими исследованиями (McLennan, 1983). Вместе с тем количественные соотношения между специфическим связыванием нейромедиатора на рецепторе и избирательным транспортом катионов через мембрану мало изучены, особенно у многоклеточных объектов, включая и культивируемые клетки нервной ткани (Кискин, Цыдренко, 1985).

Наряду с традиционными клеточными моделями для изучения функции глутаматных рецепторов в последние годы стали использовать липосомы и «мембранные везикулы» (Gregoriadis, 1983a, b). Последние структуры, образованные путем замыкания синаптических мембран в гипертоническом растворе KCl, применяются в случаях, когда необходимо сохранить ионселективные функции рецепторов в мембранном окружении (Каппег, 1978).

Возможность сопоставления связывающих и ионселективных функций глутаматных рецепторов была проверена Тейхбергом и соавт. (Teichberg et al., 1981) в мембранных везикулах. Анализ различных механизмов транспорта ионов Na^+ в нейронах и мембранных везикулах при индукции его глутаматом показал, что это сложный процесс, который состоит из ряда слагаемых (Luini et al., 1981, 1983): с одной стороны, одновременной индукции активности мембранных процессов, ответственных за перенос ионов Na^+ , с другой — изменения Na^+ -зависимых систем транспорта и поглощения глутамата (Luini et al., 1984). Более того, авторы продемонстрировали факты, свидетельствующие об активации глутаматом функции потенциалзависимых натриевых каналов (Teichberg et al., 1984).

Другой точки зрения придерживаются Чанг и Михаэлис (Chang, Michaelis, 1980), которые изучали поглощение ионов Na^+ в синапсоммах и синаптических везикулах. Согласно данным этих авторов, длительная экспозиция глутамата с указанными модельными системами вызывают десенситизацию, сходную по своим свойствам с аналогичной, регистрируемой с помощью электрофизиологических методов. Авторы считают, что индукция поглощения ионов Na^+ в модельных системах в присутствии глутамата происходит не за счет участия в этих процессах ферментов или утилизирующих глутамат систем, а прежде всего благодаря активации комплекса рецептор—ионный канал (Chang, Michaelis, 1981).

Тем не менее в пользу взаимосвязи функции глутаматных рецепторов и механизмов транспорта и поглощения глутамата свидетельствуют данные, которые были получены при использовании п-хлормеркурифенилсульфоната — ингибитора протеаз и блокатора транспорта аминокислот в клетку. Показано, что в присутствии этого агента резко повышается возбуждающий ответ нейрона на глутамат. Более того, структурные аналоги глутамата, не способные транспортироваться внутрь клеток, обладают очень высоким деполяризующим действием (eds. De Feudis, Mandel, 1981).

Ташмухамедов и др. (1983, 1985) изучали функцию глутамат-управляемых ионных каналов в бислойных липидных мембранах (БЛМ). Они показали, что проводимость бислойной мембраны со встроенным рецепторным белком резко увеличивалась при добавлении L-глутамата. Это действие блокировалось в присутствии нейротоксина паука *Argiopa lobata*. Проводимость в БЛМ со встроенными белками была чувствительна к конканавалину А и диэтиловому эфиру глутаминовой кислоты.

Было обнаружено, что за высокую проводимость в бислойных мембранах отвечают две основные белковые фракции, содержащие компоненту с M_r 32 кДа и компоненты с M_r 14 и 18 кДа. Авторы полагают, что первая фракция мембранных белков представляет собой комплекс из двух входящих в состав второй фракции субъединичных белков, которые способны организовать функционирующий ионный канал, управляемый L-глутаматом.

Кузнецов с соавт. (1977) и Коломыткин и др. (1982) осуществили встраивание частично очищенного рецептора глутамата в плоскую фосфолипидную мембрану. Глутаматсвязывающую белковую фракцию выделяли из синаптических окончаний гиппокампа крыс. Однако выделенный препарат был весьма гетерогенным, так как была использована лишь одна стадия очистки белков, солюбилизованных 1 %-ным тритоном X-100, с помощью гельфильтрации. Фракция, соответствующая связыванию белка с максимальным количеством, рассматривалась как рецептор-содержащий белок. Фосфолипидную мембрану формировали из разных фосфолипидов, включая общие фосфолипиды мозга.

При потенциалметрическом измерении проводимости бислой-

ной мембраны было обнаружено, что проводимость ее существенно зависит от встраивания белковой фракции и увеличивается в присутствии нейромедиатора. Причем увеличение проводимости, вызванное L-глутаматом, почти полностью (80 %) блокируется диэтиловым эфиром глутаминовой кислоты.

Авторы наблюдали формирование каналов двух типов: высокоскоростных, когда в ячейке присутствовали одновременно рецептор и L-глутамат, и низкоскоростных — в случае добавления рецептора по обе стороны бислойной мембраны. Предполагается, что истинно рецепторными являются каналы первого типа с проводимостью около 15—20 ПМО, т. к. проводимость их чувствительна к диэтиловому эфиру L-глутаминовой кислоты.

Данных о реконструировании глутаматсвязывающих мембранных белков в липосомы еще меньше, чем в бислойные мембраны. Имеются лишь работы группы Михаэлиса (Michaelis et al., 1981a, 1984b), в которых использованы липосомы для изучения функции глутаматных рецепторов. Так, методом озвучивания мультислойных липосом авторам удалось встроить около 26—30 % очищенного препарата белка и показать транспорт ионов $^{22}\text{Na}^+$ в липосомы. Для формирования липосом использовали также различные фосфолипиды и гликолипиды. Это исследование показало, что препараты ГМБ могут быть успешно реконструированы в липосомы и свойства белка изучены в условиях известного липидного окружения и контролируемых внешних условий взаимодействия рецептора с нейромедиатором. Однако эффективность накопления катионов липосомами в этом случае существенно зависит от количества встроенного белка и его ориентации в липосомах.

В связи со сказанным обращает на себя внимание необходимость учета ориентации белковых макромолекул в протеолипосомах, так как они могут располагаться как на поверхности, так и внутри липосомной сферы. Кроме того, рецепторные белки могут частично пересекать фосфолипидную мембрану в зависимости от ее состава. Поэтому в качестве контроля за топографией рецептора в протеолипосомах необходимо использовать либо связывающие функции рецептора по отношению к разным агонистам и антагонистам, либо иммунохимические методы.

Для того чтобы выяснить, сохраняются ли транспортные и ионселективные функции глутаматсвязывающих мембранных белков как в мембранном окружении, так и в протеолипосомах, мы попытались сравнить эти модельные системы по накоплению разных радиоактивных катионов. В качестве контроля была использована митохондриальная фракция, получаемая в ходе выделения синаптических мембран.

Измерение накопления радиоактивных ионов $^{22}\text{Na}^+$, $^{86}\text{Rb}^+$ и $^{45}\text{Ca}^{2+}$ показало существенное различие транспортных процессов в мембранах этих клеточных структур (рис. 26). При добавлении L-глутамата (10^{-4} — 10^{-6} М) наблюдали изменение транспорта ионов $^{22}\text{Na}^+$ в мембранные везикулы. Уровень накопления $^{22}\text{Na}^+$ повышался в присутствии L-глутамата почти на 100 %. Приме-

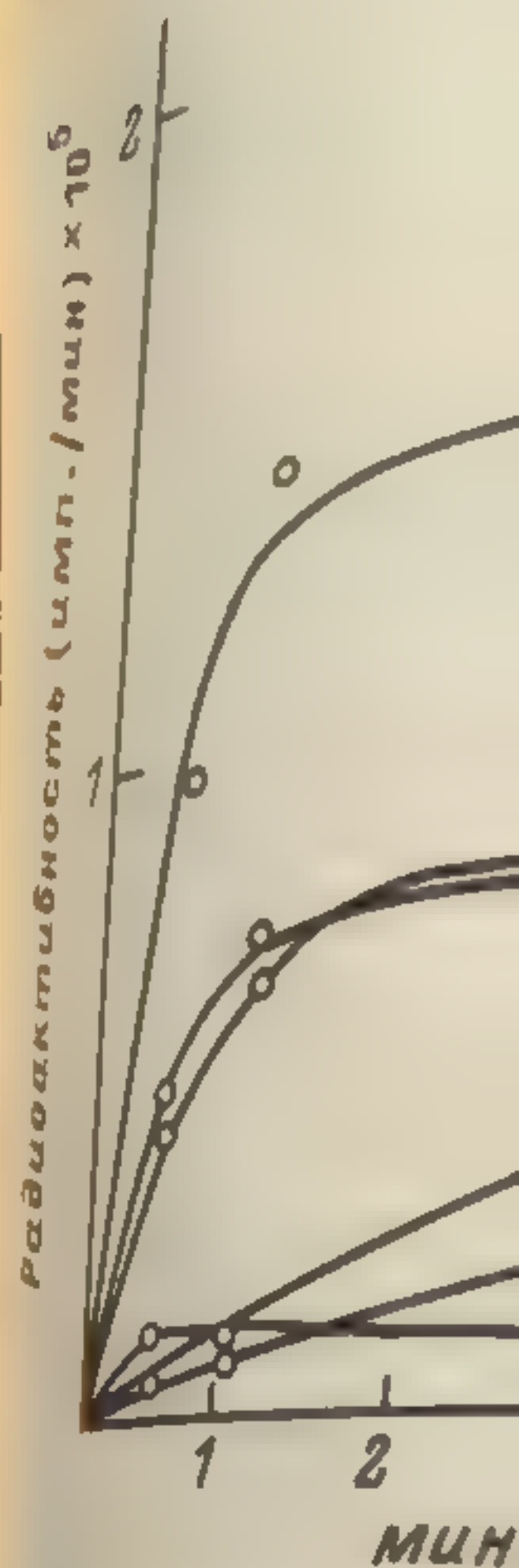


Рис. 26. Транспорт радиоактивных катионов в мембранные везикулы.

1 — $^{22}\text{Na}^+$; 2 — $^{22}\text{Na}^+$ в присутствии L-глутамата; 3 — $^{22}\text{Na}^+$ в митохондриальной фракции; 4 — $^{22}\text{Na}^+$ в митохондриальной фракции с ингибитором; 5 — $^{86}\text{Rb}^+$; 6 — $^{45}\text{Ca}^{2+}$. По оси абсцисс — время (мин), по оси ординат — радиоактивность (имп./мин.).

Частично, что поглощение не менялось. В митохондриях же накопление ионов $^{22}\text{Na}^+$ было значительно ниже, чем в мембранных везикулах. В присутствии L-глутамата ионов $^{22}\text{Na}^+$ в мембранных везикулах (1984a).

Динамика накопления ионов $^{22}\text{Na}^+$ в мембранных везикулах отчетливо различалась от таковой в митохондриях, а затем и в синаптических везикулах перед инкубацией с глутаматом, ассоциированным с удалением из системы. Для оценки степени накопления ионов $^{22}\text{Na}^+$ в мембранных везикулах и митохондриях использовались системы, либо пут-

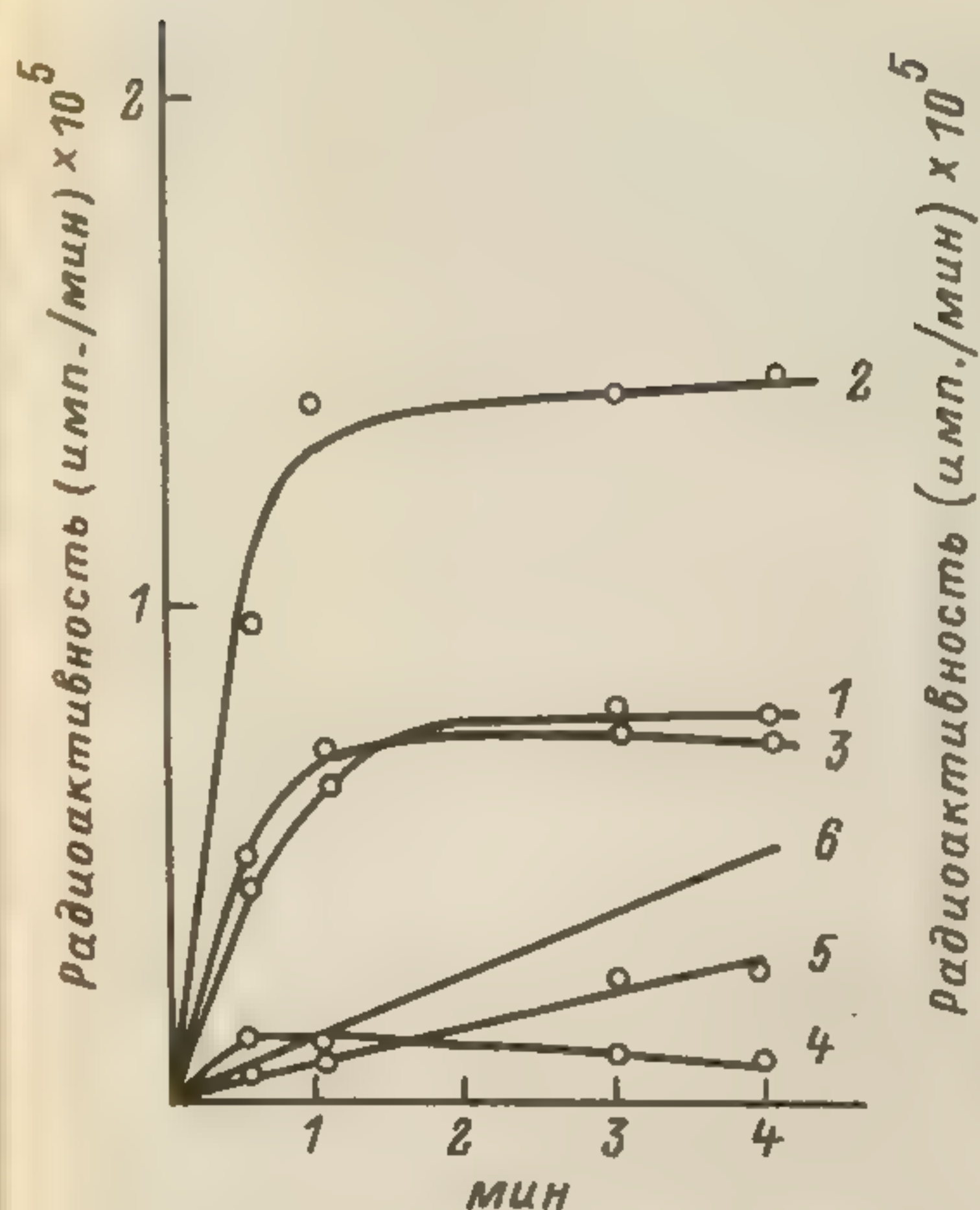


Рис. 26. Транспорт ионов в мембранные везикулы.

1 — $^{22}\text{Na}^+$; 2 — $^{22}\text{Na}^+$ в присутствии L-глутамата; 3 — $^{22}\text{Na}^+$ в присутствии эндогенного фактора, ингибирующего связывание; 4 — $^{22}\text{Na}^+$ в присутствии митохондрий; 5 — $^{86}\text{Rb}^+$; 6 — $^{45}\text{Ca}^{2+}$. По оси абсцисс — время (мин), по оси ординат — радиоактивность (имп./мин).

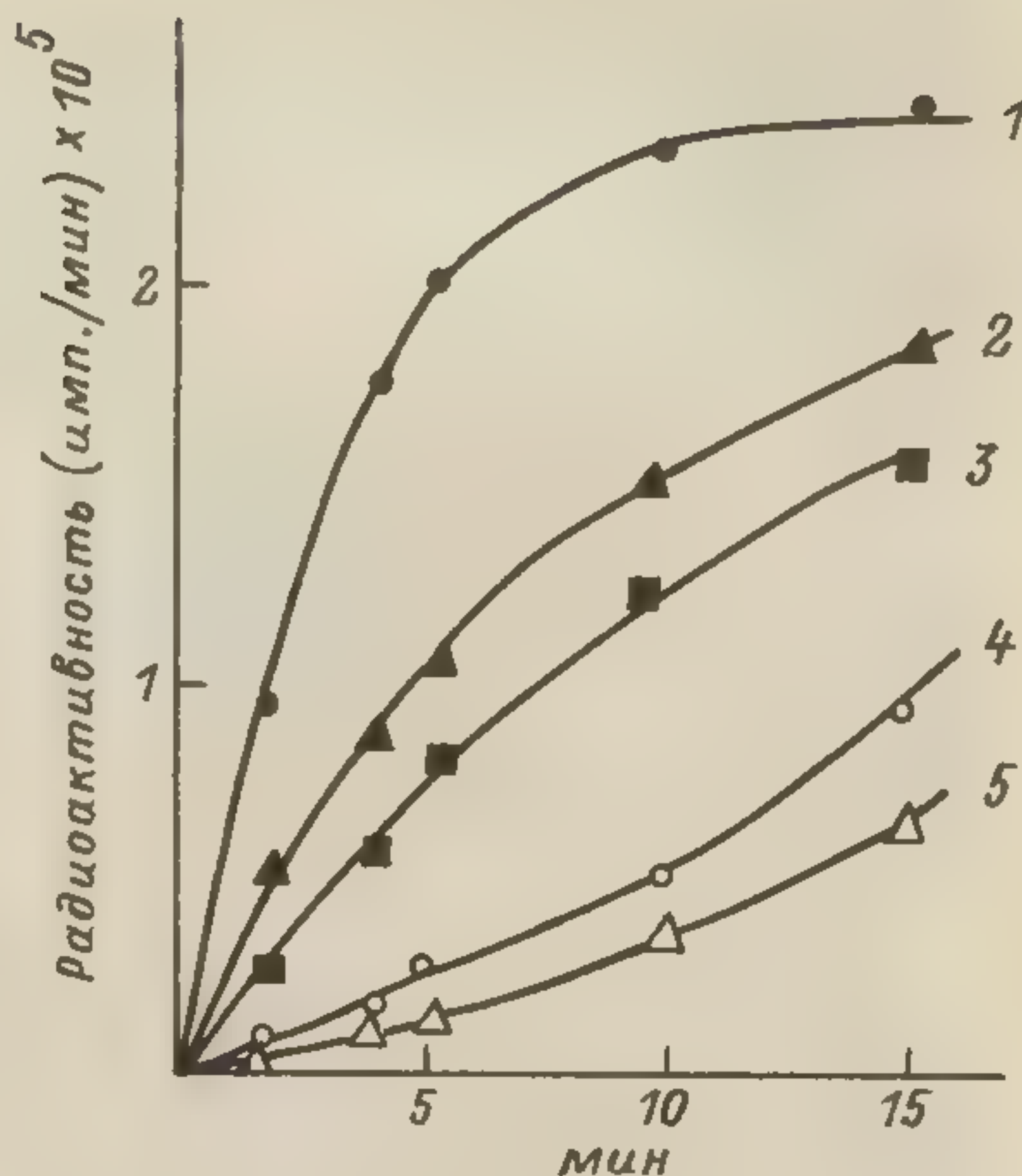


Рис. 27. Транспорт ионов в протеолипосомы.

1 — $^{22}\text{Na}^+$ в присутствии L-глутамата; 2 — $^{22}\text{Na}^+$; 3 — $^{22}\text{Na}^+$ в присутствии моноклональных антител к глутаматсвязывающим мембранным белкам; 4 — $^{45}\text{Ca}^{2+}$; 5 — $^{86}\text{Rb}^+$. Остальные обозначения, как на рис. 26.

чительно, что поглощение Ca^{2+} и Na^+ при этом практически не менялось. В митохондриях величина поглощения $^{22}\text{Na}^+$ была значительно ниже, чем в мембранных везикулах, и не менялась в присутствии L-глутамата. Таким образом, можно заключить, что мембранные везикулы способны избирательно транспортировать ионы Na^+ в присутствии L-глутамата (Дамбинова и др., 1984а).

Динамика накопления одновалентных катионов в мембранных везикулах отчетливо проявлялась лишь в первые минуты регистрации, а затем наблюдалось относительное равновесие в поглощении ионов $^{22}\text{Na}^+$, $^{86}\text{Rb}^+$. Тщательная отмывка мембранных везикул перед инкубацией с радиоактивными катионами активировала эти транспортные процессы на 60—70 %, что, по-видимому, связано с удалением эндогенного ингибитора связывания L- ^3H -глутамата, ассоциированного с синаптическими мембранами (Городинский, 1985).

Для оценки степени нативности очищенных препаратов ГМБ можно использовать реконструкцию функции рецептора в модельных системах *in vitro* либо путем встраивания фракций ГМБ в липосомы, либо путем воссоздания структуры рецептора в би-

слойной липидной мембране. Использование липосом для этой цели в биохимических экспериментах по включению радиоактивной метки оказалось более предпочтительным, так как не требовало дорогостоящей сложной системы электрофизиологической регистрации транспорта катионов через искусственную мембрану (Беседин и др., 1985).

В связи со сказанным моделирование функции и структурной организации хеморецепторного комплекса мы проводили методом реконструкции препарата ГМБ в липосомах. Были исследованы липосомы с различным липидным составом. Оказалось, что процент встраивания меченой фракции ГМБ в липосомы зависит от наличия и концентрации холестерина: при высоком его содержании резко снижалась радиоактивность белковых фракций в зоне флотирующих липосом. Липосомы, состоявшие из одних фосфолипидов, обладали наибольшей способностью встраивать препараты очищенного ГМБ.

Как выяснилось, моделирование транспортной функции глутаматных рецепторов существенно зависит от концентрации встроенного в липосомы ГМБ, а также от концентрации нейромедиатора в среде инкубации. Оказалось, что количество ГМБ для реконструкции рецепторной функции не должно быть ниже определенного предела (50 мкг/мл), так как при сравнительно низких концентрациях белка активации транспорта катионов в присутствии L-глутамата не происходило.

На рис. 27 представлены данные по эффективности накопления радиоактивных катионов Na^+ протеолипосомами в зависимости от концентрации нейромедиатора. Наибольшее накопление ионов $^{22}\text{Na}^+$ в протеолипосомах происходило при концентрации глутамата 10^{-4} М. Однако эта концентрация нейромедиатора несколько превышает физиологические действующие концентрации глутамата (10^{-6} М), необходимые для активации транспорта ионов в мембранах нейронов. Эта действующая концентрация L-глутамата обусловлена, по-видимому, тем, что в процессе солюбилизации и в ходе очистки ГМБ снижается сродство рецептора к нейромедиатору.

Величины ионной проницаемости протеолипосом в присутствии и в отсутствие L-глутамата измеряли по поглощению ионов $^{22}\text{Na}^+$, $^{86}\text{Rb}^+$, $^{45}\text{Ca}^{2+}$. В качестве контроля использовали «пустые» липосомы и липосомы со встроенным альбумином. Накопление радиоактивности регистрировали в разные временные интервалы путем ультрафильтрации (Беседин и др., 1985).

Зависимость поглощения катионов протеолипосомами в присутствии L-глутамата различалась для одно- и двухвалентных катионов. Наибольший эффект избирательной индукции транспорта нейромедиатором наблюдался для катионов $^{22}\text{Na}^+$, в то время как для $^{86}\text{Rb}^+$ скорость поглощения оставалась на исходном уровне. Динамика накопления $^{45}\text{Ca}^{2+}$ отличалась от описанной для одновалентных ионов: радиоактивность проб в этом случае появлялась позднее — через несколько минут после начала инку-

бации, что скорее всего можно связать с неспецифическим накоплением Ca^{2+} в протеолипосомах.

Структурные особенности ГМБ — наличие в структуре рецептора локальных областей, способных экспонироваться на противоположных поверхностях липидного бислоя, — определили целесообразность применения МКАТ в качестве высокоспецифичных непроникающих реагентов для изучения структурно-функциональной организации глутаматного рецептора.

Для того чтобы подтвердить, что МКАТ конкурируют за «узнающие» сайты глутаматного рецептора, исследовали возможность ингибирования МКАТ специфического связывания $\text{L-}^3\text{H}$ -глутамата с препаратами ГМБ, имеющимися на мембранных везикулах и встроенных в протеолипосомы.

При взаимодействии МКАТ с солюбилизованными препаратами ГМБ, встроенными в липосомы, была обнаружена конкуренция за связывающие участки по отношению к нейромедиатору. Однако максимальное ингибирование в этом случае составляло лишь 62 % от общего связывания $\text{L-}^3\text{H}$ -глутамата. С другой стороны, эта реконструкция очищенных ГМБ в липосомах и инкубация последних с МКАТ вызывала обратимую блокаду транспорта катионов. Блокирующее действие на транспорт катионов в протеолипосомах проявлялось при концентрации 10^{-6} М МКАТ. Эффект постепенно снижался при длительной инкубации и отмывке протеолипосом рабочим буфером.

Это свидетельствует в пользу того, что большинство узнающих участков ГМБ ориентированы на поверхности протеолипосом и способны связывать L- глутамат. По-видимому, процессы пространственной самосборки глутаматных рецепторов в протеолипосомах приводят в ряде случаев к сходной организации их на мембране нейрона.

С другой стороны, мембранные везикулы имели сравнительно низкий процент ориентированных на поверхность глутаматных рецепторов, которые связывались с МКАТ. Этим, возможно, объясняется более быстрое насыщение кинетики накопления катионов в этой модельной системе по сравнению с протеолипосомами.

Таким образом, представленные в этом разделе результаты свидетельствуют в пользу селективности функции препаратов ГМБ, реконструированных в липосомах. Очевидно, выделенный и очищенный рецептор сохраняет частично нативную конфигурацию и пространственную ориентацию в липидном окружении. Предварительные данные, полученные нами при изучении влияния аргипина на транспорт Na^+ , показали, что аргипин блокирует транспорт Na^+ в протеолипосомах. Эти результаты подтверждают точку зрения о том, что ГМБ представляют собой макромолекулярную структуру, способную организовать в липосомах функционально нативный рецепторный комплекс, управляющий избирательным транспортом ионов Na^+ . При этом создается впечатление, что ионные каналы глутаматных рецепторов нервно-мышечных синапсов

беспозвоночных и головного мозга млекопитающих имеют определенные сходства в функциональной организации и составе структурных компонентов, составляющих рецепторный комплекс на мембране.

4.2. Изучение особенностей функционирования глутаматных рецепторов в гибридных клетках нейробластомы *

Изучение механизмов функционирования глутаматных рецепторов в ткани головного мозга существенно осложняется высокой степенью ее клеточной гетерогенности. Поэтому исследования более простых систем, в частности гомогенных клеточных линий нейронов, в которых, как было показано, имеются фармакологически сходные с синаптическими мембранами типы глутаматных рецепторов, регулируемые ионами Ca^{2+} , представляют существенный интерес (Malouf et al., 1984).

Удобными моделями в этом плане являются клетки нейробластомы C1300, которые в условиях *in vitro* способны дифференцироваться по нейрональному типу (Nirenberg, 1974). Известно, что эти клетки и их соматические гибриды могут возбуждаться по типу нейронов: большинство клеток генерировали потенциал действия (Moolenaar et al., 1981).

Ионные токи, создающие потенциал действия, содержали 4 компонента: Na^{+} -, K^{+} -, Ca^{2+} -токи и ток утечки; причем кинетика вольтзависимости и фармакологические свойства их были сходны со свойствами соответствующих токов, наблюдаемых на гигантском аксоне моллюска и миелинизированном волокне лягушки (Moolenaar, Spector, 1979).

Вместе с тем было обнаружено, что плотность натриевых и калиевых каналов в культивируемых клетках в десять раз меньше, чем в нейронах (Цыдренко, 1980). Это отражалось на скорости нарастания спайка и реполяризации, влияло на амплитуду ответа и потенциал покоя, которые имели более низкие значения, чем в нормальных клетках (Костюк, Крышталь, 1981; Крышталь и др., 1982).

Несмотря на то что хемочувствительность этих клеток проявлялась сравнительно реже, чем генерация потенциалов действия, и наблюдалась огромная вариабельность клеточных культур по этому признаку, клетки нейробластомы широко использовали для изучения самых разных проблем нейробиологии (Haffner, Seeds, 1975).

Так, клетки нейробластомы и ее гибридов как относительно простые системы применялись для решения проблем биологии

* Клетки нейробластомы N18g2a и ее гибрид 78—45×8 были любезно предоставлены Т. Н. Игнатовой (ЦИН АН СССР, Ленинград). Автор выражает благодарность за интерес к работе и обучение методам культивирования.

развития и канцерогенеза, проблем генетики мозга и его системной организации (Ата-Мурадова, Зазулин, 1981), для исследования электровозбудимости в процессе созревания нейронов и формирования нервно-мышечных связей (Nelson, 1975), для изучения плазматической мембраны как регулятора роста и дифференцировки (Игнатова, 1984) и клеточных взаимодействий (Thompson et al., 1982).

Особый интерес представляет тот факт, что нейробластома содержит разнообразные элементы нейромедиаторных систем: ферменты синтеза и утилизации ряда нейротрансмиттеров, транспортные системы переноса медиаторов, рецепторы нейромедиаторов (Barker et al., 1982). Появились первые сведения о наличии в гибридных клетках нейробластомы участков рецепторного связывания L-³H-глутамата (Prasad et al., 1981). Однако до сих пор нет сведений о принадлежности этих глутаматсвязывающих участков к физиологическим глутаматным рецепторам.

В связи с этим нам казалось целесообразным сопоставить связывающие и ионтранспортные функции глутаматных рецепторов в одной модельной системе *in vitro*. Для усиления дифференцировки клеток мы применяли различные методы химического воздействия. Таким эффективным приемом для проявления выраженной морфологической дифференцировки был способ культивирования клеток с добавлением в среду диметилсульфоксида. В этом случае клетки сохраняли и усиливали свойства родительского клона, например увеличивали электровозбудимость и хемочувствительность мембран. Гибридные клетки отличались значительно большим размером сомы клеток, чем исходные клетки нейробластомы, сравнительно высоким мембранным потенциалом и устойчивостью клеточной мембраны для стабильной регистрации мембранного потенциала (МП) в течение длительного периода. Нами были исследованы клеточные культуры N18Tg2a и гибридные клетки 78—45×8, которые изучали на стадии активной пролиферации.

Клетки исходного клона (N18Tg2a) имели округлую форму, образовывали один или несколько коротких отростков, размеры их сомы не превышали в среднем 10—15 мкм (Фридлянская, 1984). Гибридные клетки в этих условиях представляли собой клетки с диаметром 50—60 мкм и короткими многочисленными отростками (рис. 28). В присутствии в среде культивирования диметилсульфоксида (ДМСО) клетки обеих линий увеличивали размеры, причем сома отдельных гибридных клеток увеличивалась иногда до 80—100 мкм. Оказалось, что для исходного клона нейробластомы среднее значение МП большинства клеток не превышало 13—17 мВ, в то время как в присутствии ДМСО он повышался до 25 мВ. Причем следует отметить, что регистрация МП в исходном клоне клеток существенно затруднялась неустойчивостью МП и легкостью повреждения клеток микроэлектродами (Дамбинова и др., 1984а).

Гибридные клетки 78—45×8 отличались большей устойчи-

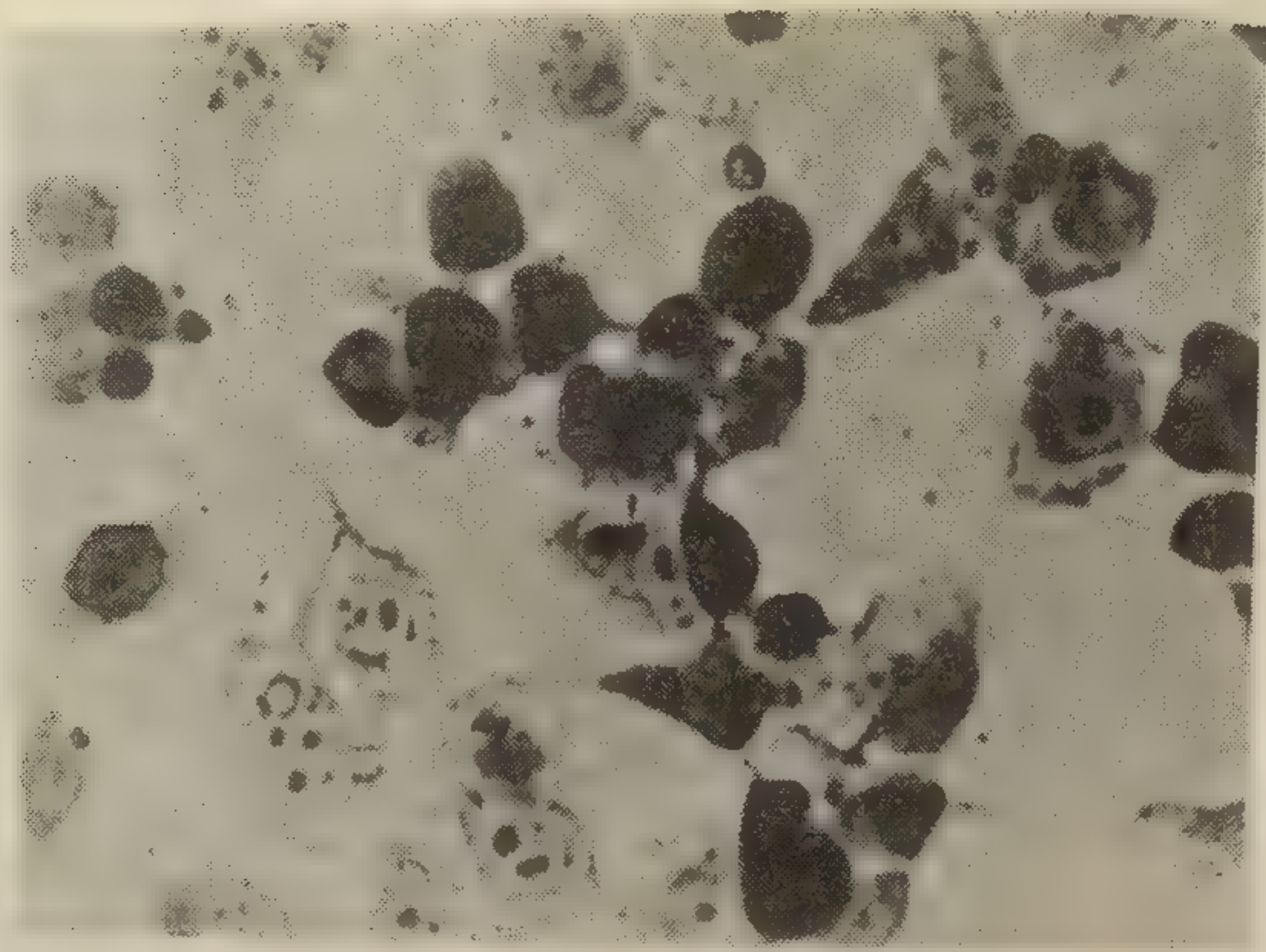


Рис. 28. Гибридные клетки нейробластомы 78=45×8, окрашенные азур-азином. Увеличение: ×10 000

востью МП, который колебался в среднем от 30 до 40 мВ. Отдельные клетки гибридного клона имели МП, достигавший значения 45—56 мВ. В присутствии ДМСО процент этих клеток увеличился, однако при длительном культивировании нейронов в присутствии этого агента МП значительно снижался.

Наблюдалась также значительная разница в физиологических ответах клеточных популяций на аппликацию нейромедиаторов. Например, из 100 клеток гибридного клона 78—45×8 только несколько клеток изменяли МП при добавлении серотонина, в то время как остальные клетки практически не давали физиологического ответа на аппликацию этого нейромедиатора.

Хемочувствительность гибридных клеток 78—45×8 практически не отличалась от этих свойств родительского клона нейробластомы. Однако культивирование гибридных клеток в присутствии ДМСО вызывало появление хемочувствительности к ацетилхолину и L-глутамату, в то время как исходные клетки N18Tg2a не реагировали на эти нейромедиаторы в аналогичных условиях. Деполаризация мембраны для обоих нейромедиаторов не превышала 30—40 % от уровня исходного мембранного потенциала, но была стабильной в течение 30—40 мин регистрации. Количество клеток, способных реагировать на данные нейромедиаторы, возрастало на 40—50 % в каждом клоне. Не исключено, что ДМСО, являясь дифференцирующим агентом, вызывает и «созревание» некоторых рецепторных комплексов на мембране культивируемых клеток. Следует отметить, что эффект существенно зависел от количества «пересевов» гибридных клеток: длительное культивирование приводило к исчезновению хемочувствительности.

Интересный эффект резкого повышения хемочувствительности мембраны гибридных клеток к L-глутамату мы наблюдали при

добавлении в среду конканавалина. Чувствительная чувствительность длительно. Этот эффект не был сравнительно мата.

Влияние Конканавалина на глутамату наблюдалось отсутствие вазией глутамат. исследованиях Конканавалина, в то время как к культивированию кластеризации картины нейронов.

Создается впечатление, что нейробластомы происходят из глутамата или, в зависимости от вазии кластеров, а глутаматозная рецепция уже имелись на мембране. На аппликацию нейромедиатора дифференцирование.

Наличие рецепторов на нейробластоме гибридного связывания. Исследовано с помощью мембранного распределения нейробластомы и ее флуоресценции.

Клетки 78—45×8 в большинстве случаев для исследования признаков явно недостаточны. Вполне возможно проявление нейромедиатора за кластеризацию биохимической дифференциации за организацию.

Развитие методов физиологических исследований с изучением нейронных систем. Однако при этом вследствие низкого уровня активности нейромедиаторов и их аналогов.

А. Дамбинова

добавлении в среду культивирования низких концентраций (10^{-6} М) конканавалина А (Кон А). В этом случае появлялась избирательная чувствительность клеток к глутамату, причем на сравнительно длительных сроках культивирования с Кон А (до 3 суток). Этот эффект наблюдался у большинства клеток с высоким МП и был сравнительно устойчив при повторных аппликациях глутамата.

Влияние Кон А на повышение чувствительности мембран к глутамату наблюдали и ранее (Кеhoe, 1978). Этот эффект объяснялся отсутствием или снятием эффекта десенситизации и активацией глутаматных рецепторов ■ присутствии Кон А. В этих исследованиях Кон А добавляли, как правило, в момент регистрации, в то время как в наших условиях клетки подвергались длительному культивированию в присутствии лектина, который вызывал кластеризацию на мембране и изменение морфологической картины нейронов.

Создается впечатление, что только ■ гибридных клетках нейробластомы происходило функциональное «созревание» рецепторов для глутамата или, возможно, их латеральная диффузия с образованием кластеров активного хеморецепторного комплекса. Глутаматусвязывающие рецепторные участки, как было нами показано, уже имелись на мембране клеток нейробластомы, но не отвечали на аппликацию нейромедиатора без специальных приемов усиления дифференцировки.

Наличие рецепторных глутаматсвязывающих участков ■ клетках нейробластомы подтверждается не только данными радиолигандного связывания L - 3H -глутамата, но и иммуофлуоресцентным методом с помощью МКАТ (Дамбинова и др., 1987). Нами исследовано распределение моноклональных антител к глутаматсвязывающим мембранным белкам на клетках исходного клона нейробластомы и ее гибрида. Было показано наличие специфической флуоресценции в обоих клонах, причем характерное свечение клеток в большей степени наблюдалось у гибридных клеток 78—45×8 (рис. 29). Вместе с тем функциональная зрелость этих клеток для исследования физиологических ответов глутаматных рецепторов явно недостаточна и требует усиления нейрональных признаков. Вполне возможно, что чувствительность мембран к глутамату проявляется на более высоком уровне морфологической и биохимической дифференцировки и зависит от факторов, ответственных за кластеризацию хеморецепторного комплекса, в частности за организацию хемовозбудимых ионных каналов в мембране нейрона.

Развитие методов культивирования нейронов и регистрации их физиологических ответов позволило преодолеть ряд трудностей, связанных с изучением таких сложных объектов, как клетки нервной системы. Однако применение этих методов оказалось ограниченным вследствие низкой дифференцированности клеток в культуре, а также методическими трудностями аппликации нейромедиаторов и их аналогов в среду инкубации клеток. Поэтому



Рис. 29. Микрофотография распределения флуоризотиоцианат-меченых моноклональных антител к глутаматсвязывающим мембранным белкам головного мозга крыс в гибридных клетках нейробластомы 78=45X8. Увеличение: $\times 30\,000$.

в последние годы более широкое распространение получили исследования механизмов активации рецепторов возбуждающих аминокислот (L-глутамата и L-аспартата) на мембранах ферментативно изолированных пирамидных нейронов гиппокампа мозга крыс (Кискин и др., 1986).

4.3. Исследование механизмов активации и блокирования ионных каналов, управляемых L-глутаматом

Хемовозбудимые ионные каналы, в том числе и глутаматуправляемые, могут существовать в трех регистрируемых состояниях: открытом (активном), закрытом (неактивном) и инактивированном (или десенситизированном) (Магазаник, 1975). Считают, что ионные каналы, управляемые нейромедиаторами, представляют собой «белковую пору», выстланную изнутри гидрофильными группами. Возможно, рецепторный участок связывания нейромедиатора и ионные каналы, управляемые ими, объединены между собой и взаимодействуют аналогично регуляторной и каталитической субъединицам сложных ферментов, как это предположено для комплекса холинорецептор—ионный канал (Changeux et al., 1980). В этом случае сродство нейромедиатора к рецептору возрастает от закрытого состояния к активному, достигая максимального значения в инактивированном состоянии.

Для выявления закономерностей функционирования глутаматуправляемых ионных каналов следует обратить внимание на дан-

ные о том, что каналы — не тамамом (Lieg и тетродотокс на хемовозбуд каналы не совла для ион

Изучение тигного глутаматного получения информации, но и дает групп белков и лов. Сведения о цировании возбупени, чем ионы глутаматуправляе проницаемости, в гиперполяризации лов для этих ион

Вполне вероятно, активированного п нейронов и их фун

Существенный и глутаматного рецепт ионной проводимост глутамата с одним

активного состояния при исследовании «ме

лять интенсивность одного ионного канал

et al., 1980, 1984, 198 и др. (1986), кинетиче

глутаматных рецептор

Данные о стехис

ства были представ (Barker, Ransom, 19

шения глутамат : ре (доза—ответ), коле

по данным Оомуры а не одной, как в перв

ним активным центром нейрона. Одной из адекватных

ирования глутаматных ф

казался метод «фиксаци

1985. Кискин и др., 1986

управляемых каналов «ф

пределение

ные о том, что тетродотоксин — блокатор электровозбудимых Na^+ -каналов — не влиял на процесс деполяризации, вызванный L-глутаматом (Lieglgansberger, Puil, 1972). Следовательно, L-глутамат и тетродотоксин не конкурировали за общие участки связывания на хемовозбудимой мембране нейрона, т. е. глутаматуправляемые каналы не совпадали по свойствам с потенциалзависимыми каналами для ионов Na^+ (Nistri, Constanti, 1979).

Изучение типов ионов, проходящих через каналы активированного глутаматного рецептора, представляет интерес не только для получения информации о геометрии глутаматуправляемых каналов, но и дает возможность предположить характер ионогенных групп белков и липидов, определяющих специфичность этих каналов. Сведения о том, что ионы Ca^{2+} играют важную роль в продуцировании возбуждающей деполяризации, хотя и в меньшей степени, чем ионы Na^+ (McLennan, 1983), предполагают наличие глутаматуправляемых Ca^{2+} -каналов. Обнаружение избирательной проницаемости, вызванной глутаматом для ионов K^+ и Cl^- при гиперполяризации клеток, свидетельствует в пользу наличия каналов для этих ионов, регулируемых глутаматными рецепторами. Вполне вероятно, что природа ионов, проходящих через каналы активированного глутаматного рецептора, определяется типом нейронов и их функциональной специализацией.

Существенный интерес для выявления структуры и функции глутаматного рецептора вызывают результаты анализа изменений ионной проводимости мембран при воздействии одной молекулы глутамата с одним активным центром. Такой подход к оценке активного состояния хемовозбудимых ионных каналов применялся при исследовании «мембранного шума», который позволил определять интенсивность и временные характеристики проводимости одного ионного канала при аппликации глутамата (Cull-Candy et al., 1980, 1984, 1987). Вместе с тем, как отмечает Крысталь и др. (1986), кинетические параметры активации ионных каналов глутаматных рецепторов в нейронах описаны крайне недостаточно.

Данные о стехиометрии глутамат-рецепторного взаимодействия были представлены ранее в работах Бэркера и Рэнсома (Barker, Ransom, 1978), которые показали, что величины соотношения глутамат : рецептор, вычисленные по кинетическим кривым (доза—ответ), колеблются в пределах единицы, в то время как по данным Оомуры и др. (Oomura et al., 1974) это соотношение равняется 2:1. Эти авторы предполагают взаимодействие двух, а не одной, как в первом случае, молекул глутамата с единственным активным центром рецептора на плазматической мембране нейрона.

Одной из адекватных моделей изучения механизмов функционирования глутаматных рецепторов в нейронах головного мозга оказался метод «фиксации концентрации» (Кискин, Цындренко, 1985; Кискин и др., 1986). Результатом анализа свойств глутаматуправляемых каналов в изолированных нейронах гиппокампа было определение «функциональных» констант диссоциации комп-

лексов рецептор—лиганд как при активации, так и при десенситизации рецепторов возбуждающих аминокислот, а также прямая регистрация процесса десенситизации (Кискин, 1987). Анализ этих данных с помощью расчета коэффициента Хилла позволяет сделать предположение о том, что для активации глутаматного рецептора необходима одна молекула L-глутамата.

Измерение вольт-амперных характеристик токов, вызванных воздействием L-глутамата и его агонистов каината и квисквалата, обнаружило, что эти токи, переносимые преимущественно ионами Na^+ и K^+ , линейно зависят от потенциала и имеют один и тот же потенциал реверсии (Кискин и др., 1986). Следовательно, рецепторы, активируемые L-глутаматом, каинатом и квисквалатом, управляют каналами, сходными по потенциалозависимости и ионной проницаемости. Это предполагает идентичность рецепторов, на которые воздействуют агонисты (Кискин и др., 1985).

Исследование количественных характеристик взаимодействия L-глутамата и его аналогов с рецепторами возбуждающих аминокислот в мембране нейронов головного мозга показало, что в функционировании комплекса рецептор—ионный канал существенную роль играют SH-группы белка (Кискин, 1987). В качестве реагента, модифицирующего SH-группы, были использованы соли ртути. Оказалось, что глутамат- и каинат-активируемые токи полностью и необратимо блокировались ионами Hg^{2+} ($2 \cdot 10^{-9}$ — $2 \cdot 10^{-5}$ М), причем аппликация глутатиона или цистеина снимала в большинстве случаев блокирующее действие ртутьсодержащих соединений. Восстановления ответов нельзя было добиться, если в среду инкубации добавляли вещества, не содержащие свободные SH-группы. По-видимому, в активации рецепторов L-глутамата принимают участие конформационные перестройки субъединиц, обеспечиваемые дисульфидными ($-\text{S}-\text{S}-$) связями, так как агонисты непосредственно не взаимодействуют с SH-группами. Пока неясна локализация этих групп в молекуле рецептора, находятся ли они в рецепторном участке или в канальной части белкового комплекса.

Одним из информативных подходов к исследованию свойств синаптических ионных каналов является изучение воздействия на них фармакологических и природных блокаторов (Магазаник и др., 1984, 1986). Этот подход начинает широко развиваться в связи с появлением избирательных природных блокаторов глутаматуправляемых ионных каналов (Гришин и др., 1986). Кроме того, были обнаружены эффективные и избирательные фармакологические блокаторы каналов, чувствительных к L-глутамату (константа скорости взаимодействия с открытым каналом лежит в пределах 0.5 — $1.5 \cdot 10^{-7} \text{ М}^{-1} \text{ С}^{-1}$) (Антонов и др., 1985). Пока известны немногочисленные блокаторы глутаматных каналов, синтезированные химическим путем, причем все они проявляли свой эффект лишь в относительно высоких концентрациях (Nowak et al., 1984; Stevens, 1986). С другой стороны, Магазаник и др. (1984) обнаружили, что найденные ими фармакологические блокаторы

в 100 раз больше, чем каналы син-
по сравнению с тем,
что эти блокаторы
каналом и влияют на
ством к активации

Из яда
токсин — аргинин-
наптическим
мясной мухи
постсинаптическим
зывает снижение
ческих токов и
с константами
константой диссо-
обнаружено, что
каналами с K_d

Одним из синап-
механизмов акти-
рецепторов может
к разным антиген-
антитела способ-
ным антигенным
ные и транспорт-
изучении функци-
моллюска *Planor-
детерминантам р-
действие на физич-
действие L-глута-
вало снижение ги-
женного у педал-
нова и др., 19876)
инкубации не из-
сдвиг МП нейрон-
предварительной*

Для модули-
физиологическо-
вать, что полу-
боту ионного
ствию нейром-
Известно, что
рость десенсити-
воздействия пост-
избежать десенси-
растительным лек-
показано, что ис-
искажений в измер-
иатных рецепторов
мени жизни этих к-

в 100 раз более эффективно действуют на глутаматчувствительные каналы синаптических зон мышечных волокон личинки мухи по сравнению с тубокурарином и хлоризондамином. Показано, что эти блокаторы с высокой скоростью связывались с открытым каналом и медленно его покидали, т. е. обладали высоким сродством к активным глутаматным рецепторам.

Из яда пауков *Argiopa lobata* выделен природный нейротоксин — аргиопин, обладающий сильным блокирующим постсинаптическим действием на глутаматергические синапсы личинки мясной мухи (Магазаник и др., 1986). Аргиопин обладал только постсинаптическим эффектом: в концентрации $3 \cdot 10^{-7}$ М он вызывал снижение на 50 % амплитуды возбуждающих постсинаптических токов и оказался способным блокировать открытые каналы с константами $K = (1.0 \pm 0.3) \cdot 10^{-8} \text{ М}^{-1} \text{ С}^{-1}$ и $K_d = (55 \pm 12) \text{ с}^{-1}$ и константой диссоциации $K_d = (6.7 \pm 1.5) \cdot 10^{-7} \text{ М}$. Кроме того, обнаружено, что аргиопин взаимодействовал также с закрытыми каналами с $K_d = (4.4 \pm 1.4) \cdot 10^{-7} \text{ М}$.

Одним из современных перспективных инструментов анализа механизмов активации и блокирования функции глутаматных рецепторов могут служить моноклональные антитела, полученные к разным антигенным детерминантам рецепторного белка. Эти антитела способны взаимодействовать специфически с определенным антигенным участком, модулируя или блокируя ионселективные и транспортные функции (Дамбинова и др., 1984). Так, при изучении функционирования глутаматных рецепторов в нейронах моллюска *Planorbis cognatus* оказалось, что МКАТ к узнающим детерминантам рецептора оказывают существенное модулирующее действие на физиологические ответы нейронов. Обнаружено, что действие L-глутамата на рецепторы в присутствии МКАТ вызывало снижение гиперполяризующего ответа, обычно хорошо выраженного у педальных нейронов пресноводного моллюска (Дамбинова и др., 1987). Аппликация очищенных фракций МКАТ в среду инкубации не изменяла мембранный потенциал клеток. Между тем сдвиг МП нейронов в ответ на L-глутамат наблюдался в случае предварительной инкубации с антителами.

Для модулирующего действия МКАТ не имеет значения, какой физиологический ответ наблюдался у нейрона. Можно представить, что полученные антитела не влияют непосредственно на работу ионного канала, а, вероятнее всего, препятствуют взаимодействию нейромедиатора с рецептором.

Известно, что глутаматные рецепторы отличается высокая скорость десенситизации, т. е. они быстро инактивируются во время воздействия постоянной концентрации L-глутамата. Для того чтобы избежать десенситизации, исследователи обрабатывают препараты растительным лектином — Кон А (Kehoe, 1978). Впоследствии было показано, что использование Кон А не вносило существенных искажений в измерение кинетики активации и блокирования глутаматных рецепторов, хотя наблюдали некоторое уменьшение времени жизни этих каналов (Магазаник и др., 1984).

Важной характерной чертой десенситизации L-глутаматных ответов нейронов гиппокампа является независимость ее кинетики от концентрации агониста и от поддерживаемого на мембране потенциала (Кискин, 1987). Среди исследованных аналогов L-глутамата были обнаружены как вещества, активирующие рецепторы, но не вызывающие их десенситизации (каиновая кислота и домоат), так и вещества, вызывающие лишь десенситизацию рецепторов (иботенат).

Эти факты дали возможность Крышталю и сотр. (1986) предположить, что глутаматные рецепторы имеют особые специфические центры для связывания агонистов — «центры десенситизации», причем сродство L-глутамата и его агонистов к этим центрам существенно выше, чем к центрам активации. На основании этой гипотезы авторы объясняют данные независимости кинетики десенситизации от концентрации агонистов тем, что все центры десенситизации в первую очередь реагируют с молекулами агонистов и дальнейшее развитие процесса десенситизации определяется уже внутренними конформационными перестройками комплекса рецептор—ионный канал. Такая «двухцентровая» схема глутаматного рецептора позволяет описать ряд экспериментальных данных, полученных при измерении кинетики и стационарных характеристик глутаматактивируемых ионных токов.

Таким образом, сопоставление данных количественных характеристик ионных каналов, управляемых глутаматом в синапсах позвоночных и беспозвоночных, свидетельствует в пользу различия механизмов активации ионселективных каналов глутаматных рецепторов, причем у последних они характеризуются более высокой кооперативностью и потенциалозависимостью кинетики спада глутаматактивируемого тока. Это предполагает поиск новых фармакологических и природных блокаторов глутаматных рецепторов, избирательно действующих на нервно-мышечные синапсы и центральные синапсы млекопитающих.

4.4. Регуляция функции глутаматных рецепторов головного мозга

Понятие «регуляция функции рецепторов» объединяет широкий класс эндогенных и экзогенных воздействий на постсинаптическую мембрану, приводящих не просто к изменению молекулярных свойств мембранных компонентов, но и к соответствующему изменению эффективности синаптической передачи.

Имеются две альтернативы относительно механизмов регуляции синаптической эффективности: изменение сродства нейромедиатора к рецептору или вариации количества рецепторных молекул на постсинаптической мембране.

Следует отметить, что длительное премея доминировала точка зрения, согласно которой местом активных пластических сдвигов метаболизма нейронов является пресинаптическая мембрана, кон-

тролирующая метаболизм и выброс нейромедиатора. В пользу этой точки зрения свидетельствовали многочисленные факты, указывающие на изменение выброса квантов медиатора при формировании различных видов деятельности в головном мозгу. Постсинаптическим структурам при этом отводили либо пассивную роль, либо их вообще не рассматривали в качестве участников синаптических событий.

Решение вопросов о механизмах синаптической пластичности осложнилось появлением данных об огромном числе нейроактивных пептидов, обнаруженных в мозгу млекопитающих. Необходимость объяснения многих фактов, имеющих непосредственное отношение к процессам приема и перекодировки химических сигналов в нервной системе, заставила исследователей обратиться к экспериментальным данным, свидетельствующим об активности постсинаптических мембран в регуляции эффективности межклеточных взаимодействий в ткани головного мозга (Комиссаров, 1985, 1986).

Как уже упоминалось, истинное рецепторное взаимодействие глутамата с мембранами не зависит от присутствия ионов Na^+ , в то время как транспорт и поглощение глутамата на мембране требует высоких концентраций этих ионов (Foster, Roberts, 1978). Для рецепторов глутамата была выявлена зависимость лиганд-связывающих характеристик от присутствия в среде инкубации одновалентных катионов. Оказалось, что Rb^+ , Cs^+ , и K^+ обладали дозозависимым ингибирующим действием, тогда как ионы Na^+ имели бифазную зависимость в широком диапазоне концентраций (Baudry, Lynch, 1979).

Двухвалентные катионы, в частности Ca^{2+} и Mg^{2+} , оказывали значительный стимулирующий эффект на связывание радиоактивного глутамата с синаптическими мембранами, причем ионы Ca^{2+} в очень низких концентрациях преимущественно повышали количество связывающих участков для глутамата без изменения сродства рецепторов к нейромедиатору (Baudry et al., 1981).

Это обстоятельство позволило Бодри и Линчу (Baudry, Lynch, 1981, 1983а, б) предположить, что Ca^{2+} стимулирует появление «дополнительных» глутаматных рецепторов за счет активации Ca^{2+} -зависимых протеаз, «демаскирующих» глутаматчувствительные участки постсинаптических мембран. Авторы допускали, что эффективность синаптической передачи в этом случае резко возрастает, как, например, в гиппокампе при посттетанической потенциации благодаря появлению новых или «демаскированных» глутаматных рецепторов.

Стимулирующий эффект ионов Ca^{2+} другие исследователи (Wittemore et al., 1983) объясняют существованием специфических Ca^{2+} -независимых и Ca^{2+}/Cl -зависимых глутаматсвязывающих участков, обладающих одинаковым сродством к лиганду, но значительно различающихся по емкости рецепторов на мембране (Ogita et al., 1986а).

При внимательном рассмотрении этих гипотез видно, что они

не противоречат друг другу, а дополняют общетеоретические представления о возможных регуляторных механизмах эффективного взаимодействия в центральных синапсах.

Состояние мембраносвязанных глутаматных рецепторов определяется также и состоянием липидного окружения белковой макромолекулы (Foster et al., 1982). Как выяснилось, любая обработка синаптических мембран реагентами, действующими на липиды, приводит к необратимому ингибированию связывания радиоактивного глутамата (Michaelis et al., 1981a). Подтверждением такого предположения явилось выделение из синаптических мембран фактора ганглиозидной природы, который, по мнению некоторых исследователей, регулирует активность глутаматных рецепторов (Hollmann, Seitert, 1986).

Участие фосфолипидов в регуляции глутаматных рецепторов было теоретически обосновано еще в 1960 г. Кертисом и Уоткинсом (Curtis, Watkins, 1960), которые показали сходство полярной группы фосфатидилсерина со структурой глутамата. Впоследствии это предположение подтвердилось результатами химико-фармакологических экспериментов (Fagg, Foster, 1983; Пиотровский и др., 1986).

Не менее интересные данные об участии разных фосфолипидов в сборке и функционировании глутаматного рецептора были получены в исследованиях по реконструкции его из частично очищенных фракций мембранного белка (Кузнецов и др., 1979). По этим предварительным данным создается впечатление, что липидное окружение белковой молекулы влияет на функциональное состояние рецептора и поддерживает его в рабочей конформации (Ташмухамедов и др., 1983).

Интеграция электрических и метаболических процессов на мембранах нейронов подразумевает наличие в них специальных факторов, способных служить передатчиками изменений на внешней мембране внутрь клетки. Как показано многочисленными работами, роль таких молекулярных интеграторов играют внутриклеточные «вторичные посредники» — циклические нуклеотиды и ионы Ca^{2+} (Перцева, 1976, 1982).

В настоящее время механизмы регуляции через внутриклеточные «вторичные посредники» продемонстрированы практически для всех рецепторных структур, в частности и для глутаматных рецепторов (Этингоф, 1987).

Однако сопряжено ли постсинаптическое взаимодействие глутамата с системой нуклеотидов непосредственно в синапсах, пока неясно. Известно, что инкубация срезов мозга морской свинки (Shimizu et al., 1974) или мозжечка крыс (Foster, Roberts, 1980) с глутаматом резко увеличивает содержание сАМР. Несмотря на то что данные не были подтверждены для других млекопитающих (Сох, 1977), такой эффект наблюдался в нервно-мышечных синапсах насекомых, в которых была обнаружена специфическая глутаматчувствительная аденилатциклаза (Robinson, 1980).

Большинство исследователей склоняется в пользу гипотезы

о возможном внесинаптическом сосуществовании системы Ca^{2+} -циклические нуклеотиды с аминокислотными рецепторами ЦНС. Так, для глутаматных рецепторов оказалось, что более важную регуляторную роль играют cGMP и Ca^{2+} (Carthwaite, Balaze, 1978). Изучение особенностей влияния последних привело некоторых исследователей к выводу о возможности внесинаптической локализации глутаматных рецепторов, связанных с глутаматчувствительной гуанилатциклазой. Полагают, что данный фермент может входить в систему активного транспорта глутамата вне синапса (Carthwaite, Balaze, 1981; Cartwaite et al., 1986).

Участие гуаниловых нуклеотидов в регуляции узнающей функции глутаматных рецепторов можно проиллюстрировать результатами экспериментов по специфическому связыванию радиоактивного глутамата с синаптическими мембранами. Обнаружено, что только cGMP способен ингибировать рецепторное связывание путем снижения сродства глутамата к рецептору. Количество связывающихся участков в этом случае не изменялось. Активность гуаниловых нуклеотидов убывала в ряду: cGMP , GTP , GDP , гуанозин (Sharif, Roberts, 1980b, 1981).

Большинство рецепторов глутамата имеет синаптическую локализацию и участвует в проведении высокоскоростных сигналов. Поэтому естественно предположить, что в механизм регуляции функции быстродействующих глутаматных рецепторов должны включаться модуляторы, способные быстро изменять конформацию глутаматуправляемых ионных каналов.

Действительно, в последние годы стали накапливаться данные о модулирующем действии малых пептидов на активность глутаматных рецепторов. Так, появились сведения о выделении N-ацетиласпартилглутамата, который ингибировал специфическое связывание радиоактивного глутамата с синаптическими мембранами, причем его сродство было выше, чем у самого нейромедиатора (Zazcek et al., 1983). Хотя авторы пишут о модулирующем действии этого низкомолекулярного пептида на глутаматные рецепторы, они все же склоняются в пользу медиаторной роли спазминовой кислоты (тривиальное название N-ацетиласпартилглутамата) (Köller, Coyle, 1984). Позднее была опубликована работа других исследователей (Riveros, Orrego, 1984), в которой были поставлены под сомнение выводы предыдущих авторов о том, что указанный пептид является нейромедиатором в мозгу млекопитающих и способен оказывать возбуждающий эпилептиформный эффект на грызунов.

Вместе с тем возможность существования специфических модуляторов пептидной природы для глутаматных рецепторов кажется теоретически вполне обоснованной, и появление в последние годы конкретных экспериментальных фактов подтверждает эту интересную гипотезу (Дамбинова, 1983).

К первым фактам, свидетельствующим в пользу этого предположения, могут быть отнесены результаты, которые были получены при активации хемовозбудимых Na^{+} -токов в срезах стриатума

(Fagg, Foster, 1983). Было убедительно продемонстрировано, что γ -глутамилные дипептиды с β -конформацией являются хорошими антагонистами глутаматных рецепторов, например NMDA-типов. Наиболее яркий эффект наблюдали для γ -глутамилглицина (см. раздел 2.2).

С другой стороны, появились данные о повышении связывания глутамата и его аналогов в присутствии глутаматсодержащих пептидов. Большой эффективностью в этом случае обладали фенилаланилглутамат, лейцилглутамат и метионилглутамат (Пиотровский, 1987). Однако эта закономерность не подтвердилась для циклического аналога глутамата — каиновой кислоты. Возможно, что глутамилпептиды, участвующие в процессах транспорта глутамата в синапсе, конкурируют с каиновой кислотой за участки связывания, поскольку последней также приписывают участие в процессах специфического поглощения нейромедиатора в синапсе (Coyle, 1983).

Как видно из представленных в данном разделе фактов, проблемы регуляции функции глутаматных рецепторов находятся пока на стадии гипотез. Вместе с тем справедливость высказанных предположений уже подтверждается рядом клинико-экспериментальных фактов. Так, появились данные об эффективном антиконвульсантном действии некоторых глицилсодержащих пептидов и γ -аминовалериановой кислоты, которые участвуют в регуляции транспорта медиаторных аминокислот, включая глутамат (Samuels et al., 1983).

Пока мы касались лишь механизмов, участвующих в регуляции самого взаимодействия глутамата с мембранами. Однако этим не исчерпывается все разнообразие клеточных регуляторных процессов, которые контролируют активность функции глутаматных и других нейрорецепторов. Заслуживают внимания в этом плане данные, касающиеся посттрансляционной модификации рецепторных белков, которые не только регулируют функцию мембранных компонентов, но и, как полагает ряд исследователей, способны участвовать в механизмах формирования следов памяти (Кругликов, 1981; Микеладзе, 1986).

Важно отметить, что на полирецепторной мембране нейрона происходит взаимозависимая количественная регуляция разных рецепторных систем, включая «каналобразующие» рецепторы для глутамата. Не исключено, что в состав многих рецепторных систем для нейромедиаторов входят одни и те же белковые структуры, различающиеся по своим узнающим и регулирующим центрам, как это было показано для дофаминовых, адрено- и холинорецепторов (Venter, Fraser, 1984).

Этот факт имеет принципиальное значение для изучения возможностей регуляции нейрорецепторов. Если в состав эффекторных систем различных типов рецепторов входят одинаковые структуры, то, воздействуя на них определенным образом, можно одновременно изменять функцию нескольких рецепторов в желательном направлении. Можно предположить, что некоторые наиболее

эффективные лекарственные средства способны действовать на межрецепторном уровне.

Для объективной характеристики возможных путей регуляции нейрорецепторов, в том числе глутаматных рецепторов, следует упомянуть не только процессы регуляции синтеза рецепторных белков на мембране, но и рассмотреть некоторые реакции биодegradации этих компонентов, которые ответственны за общее количество активно функционирующих рецепторов на нейронах. Предполагается, что регуляция процесса биодegradации происходит путем интернализации — удаления внутрь клетки и затем попадания в лизосомы, где происходит обычно лишь частичное расщепление белковых субъединиц (Сергеев, Шимановский, 1987). Оставшиеся субъединицы рецептора могут рециклироваться и появиться снова на поверхности клеток. Как эти процессы идут конкретно у глутаматных рецепторов, пока неясно. Остается только полагать, что общие механизмы рециклирования у большинства нейрорецепторов схожи. Очевидно, этот механизм позволяет клетке быстрее восстанавливать уровень хемочувствительности нейрональных мембран без активации соответствующих генов-регуляторов (Nonamed et al., 1984).

Интересные зависимости изменения количества глутаматных рецепторов наблюдались в коре больших полушарий и гиппокампе крыс линии КМ с генетической склонностью к аудиогенным судорожным припадкам во время судорожных реакций (Дамбинова, Городинский, 1982; Демина и др.; 1982). Причины такого изменения количества глутаматных рецепторов до и после аудиогенных судорог могут быть связаны с дисфункцией генетического аппарата нейронов гиппокампа, в которых отмечали изменение синтеза РНК в ядрах клеток (Разумовская и др., 1981).

Таким образом, суммируя вышеизложенное, можно представить, что глутаматные рецепторы представляют собой сложный регуляторный комплекс на мембране, взаимодействие субъединиц которого зависит от целого ряда факторов: наличия катионов, циклических нуклеотидов, ганглиозидов и некоторых глутаматсодержащих пептидов. Известно, что выброс нейромедиаторов в синапс обычно сопровождается повышением концентрации ионов Ca^{2+} , который запускает целый ряд Ca^{2+} -зависимых процессов на мембране нейрона. Можно допустить, что одним из таких событий является диссоциация факторов пептидной природы, управляемая ионами Ca^{2+} . Если это так, то в условиях высокой концентрации Ca^{2+} отделяются определенные глутаматсодержащие пептиды, которые способствуют «демаскировке» активных центров рецептора (Городинский, 1985).

В этом случае можно ожидать, что дополнительно открытые «узнающие» участки рецептора способны связывать сразу несколько молекул нейромедиатора. Очевидно, такое множественное воздействие L-глутамата сразу на несколько «узнающих» центров может привести к существенному изменению структурно-функциональной организации рецептора и появлению так называемых

каналов сверхпроводимости для ионов Na^+ , которые могут включать в свой комплекс и систему скоростной утилизации нейромедиаторов (Дамбинова, 1983).

Можно допустить, что хеморецепторный комплекс, «узнающий» L-глутамат, имеет несколько модуляторных участков связывания, которые определяют режим эндогенной активации и блокирования глутаматного рецептора. Анализ механизмов рецепторного связывания L-глутамата с синаптическими мембранами свидетельствует о том, что сродство нейромедиатора к рецептору не остается постоянным в присутствии разных модуляторов, а может изменяться от низкой аффинности к средней и высокой степеням сродства, которые, как полагают, соответствуют разным конформационным состояниям хеморецепторного комплекса. Существенное значение в этих процессах, по-видимому, принадлежит низкомолекулярным факторам пептидной природы.

Вопрос о молекулярном строении синаптических регуляторных факторов пептидной природы остается пока открытым. Не исключено, что одним из этих факторов может оказаться выделенный нами эндогенный ингибитор специфического связывания — ФИС. Предполагаемое наличие в его структуре нескольких остатков глутаминовой кислоты укладывается в представление об одновременной «маскировке» нескольких «узнающих» участков в структуре активного центра рецептора, возможно отстоящих на расстоянии, соответствующем $-(\text{CH}_2)_n-$, где $n=2$ или 8 (см. раздел 2.3).

Регуляция эффективности синаптической передачи нейронов определяется не только процессами активации связывания L-глутамата с «узнающими» участками рецептора, не только «плотностью» активных глутаматных рецепторов на мембране, но также и взаимной организацией отдельных структурных субъединиц макромолекулы и их взаимодействием в рецепторном комплексе.

Механизмы функционирования глутаматных рецепторов нуждаются в дополнительных исследованиях. Особенно это касается факта существования глутаматных рецепторов в разных дискретных состояниях ионного канала: неактивного (закрытого), активного (открытого) и десенситизированного (инактивированного). Несмотря на это, уже сейчас можно видеть, что глутаматный рецептор представляет собой единый гликопротеид-липидный комплекс на мембране нейрона, имеющий три важных структурно-функциональных участка: рецепторный, ионофорный и модуляторный участки связывания лигандов.

ЗАКЛЮ

Термин

логии и медици

мембранных

анализируемыми стру

нала и запуска

Для подавляюще

анных рецептор

ны, существован

их, касающихся и

пока крайне

которые из них, н

булинов и рецеп

рецепторы и др.

Следует отмети

ных взаимодейств

мерной вследствие

химическое разд

«новых» рецеп

интезированных с

Очевидно, нельз

мембранный рецеп

особенную связыва

синтетического

ряде исследований

«белки ка

С нашей точки з

артину понимани

предует признать, ч

структурами на по

«эволюцией д

функциональн

неспецифическ

любого хими

действиями биолог

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Термин «клеточные рецепторы» в различных разделах биологии и медицины понимается по-разному. Однако общим для всех мембранных рецепторов является то, что они являются специальными структурами для приема, переработки химического сигнала и запуска специфической функции клетки.

Для подавляющего большинства известных на сегодня мембранных рецепторов сложилась типичная ситуация: они обнаружены, существование их доказано, вместе с тем развернутых данных, касающихся их природы, физико-химических свойств и функций, пока крайне недостаточно. Исключение составляют лишь некоторые из них, например холинорецепторы, рецепторы иммуноглобулинов и рецепторы инсулина, бензодиазепиновые и опиатные рецепторы и др.

Следует отметить, что иногда ссылка на изученность рецепторных взаимодействий и функций рецептора оказывается неправомерной вследствие исследования лишь простого ответа клетки на химическое раздражение. Этим, вероятно, объясняется большое число «новых» рецепторов на мембранах нейронов для множества синтезированных соединений.

Очевидно, нельзя также согласиться с той точкой зрения, что мембранный рецептор представляет собой любую макромолекулу, способную связывать какую-либо малую молекулу природного или синтетического происхождения, как это иногда представляют в ряде исследований. Более того, в некоторых работах допускают понятия «белки как рецептор-несущие молекулы» или «РНК-рецепторные участники» и др.

С нашей точки зрения, подобные взгляды существенно путают картину понимания общебиологической роли клеточных рецепторов в функционировании органов и тканей живого организма. Следует признать, что они являются не случайно организованными структурами на поверхности клеток, а генетически «предусмотрены» эволюцией для точного обеспечения конкретной физиологической функции в клетке. Вполне возможно, что данные о наличии неспецифических многообразных «откликов» клеток на практически любое химическое воздействие связаны с определенными свойствами биологических мембран, например способностью их

структурных компонентов диффундировать в мембране при воздействии на них «новыми» фармакологическими веществами, образуя в зависимости от длительности контакта более или менее стабильный «псевдорецептор».

Истинное рецепторное взаимодействие, закрепленное в ходе эволюции, предполагает наличие генетически детерминированного структурного комплекса в составе клеточных мембран, состоящего по крайней мере из трех основных компонентов: лигандузнающего и модулирующего центров молекулы и структуры, способной передавать полученный сигнал для регуляции биологической функции клетки. В качестве последней структуры могут выступать как определенные белки, сопряженные с системой внутриклеточных посредников, так и протеолипиды, образующие «каналы», «поры» и др.

Согласно литературным и нашим данным, глутаматный рецептор представляет собой единый макромолекулярный комплекс, состоящий из многокомпонентных субъединиц, регулирующих определенную последовательность событий на хемовозбудимой мембране нейрона. Скорость общего процесса зависит, возможно, от типа проходящего в клетку иона и лимитируется стадией открывания ионселективного канала. Функция связывания L-глутамата и, по-видимому, функция открывания ионного канала контролируются несколькими факторами регуляции и определенным ионным окружением в синапсе.

Кинетика процесса существенно зависит от утилизации или инактивации молекулы глутамата на мембране. Для глутаматных рецепторов можно представить три возможных регуляторных состояния: активное, неактивное и десенситизированное. В последнем случае аналогично ферментативному катализу происходит угнетение активности рецептора при длительном взаимодействии с нейромедиатором, если системы транспорта L-глутамата и его устранения ингибированы в клетке. Допустимо предположение, что известные типы глутаматных рецепторов представляют собой изоформы мембранного белка аналогично существующим изоферментам. Возможно, что предполагаемые «изорецепторы» состоят из разных сочетаний определенных белковых субъединиц, формирующих разнообразные типы ионных каналов. Это предположение требует дальнейших комплексных экспериментальных исследований структуры и функции глутаматных рецепторов ЦНС.

Особое внимание хотелось бы обратить на тот факт, что в структуру мультирецепторного комплекса, ответственного за хемовозбуждение, входят, по-видимому, и компоненты, которые способствуют быстрой утилизации L-глутамата из синапса. Указанный факт крайне важен для рецепторов, которые имеют отношение к обратному захвату нейромедиатора из синапса через концевую терминаль (см. отдел 1.1).

Несмотря на то что представление о медиаторной функции возбуждающих аминокислот возникло более двух десятилетий назад, наиболее существенный прогресс в этой области приходится лишь на самое последнее время. Интенсивное изучение глутамат-

ных рецепторов и глутаматутилизирующих систем в физиологическом, нейрохимическом и фармакологическом аспектах привело к расширению теоретических представлений о возможном значении этого класса возбуждающих рецепторов в регуляции системных поведенческих процессов у млекопитающих, включая человека.

Большой интерес в этом плане представляют дальнейшие исследования, имеющие целью раскрытие молекулярных механизмов участия аминокислотных рецепторов в процессах функционирования нервной системы в нормальных и патологических условиях.

Вполне возможно, что в данном случае нейрорецепторы, в том числе глутаматные рецепторы, могут быть использованы в качестве маркеров специфических функциональных взаимодействий в головном мозгу у высших млекопитающих в процессе выполнения разных видов деятельности и поведенческих реакций. Такие исследования предполагают применение в клинике нервных болезней принципиально новых способов прижизненной регистрации метаболизма нейрорецепторов в головном мозгу у человека, например метода позитронно-эмиссионной компьютерной томографии.

Другой особенностью перспективных исследований глутаматных рецепторов ЦНС является установление природных закономерностей функционирования их в условиях патологических процессов мозга человека. К настоящему времени уже получены убедительные доказательства вовлечения глутаматных рецепторов в патохимию ряда заболеваний ЦНС (эпилепсия, хорей Гентингтона, аффективные расстройства и др.). Намечились основные направления создания фармакологически активных веществ, способных взаимодействовать с различными звеньями глутаматергической передачи нервных импульсов. Гетерогенность рецепторов глутамата создает предпосылки для поиска веществ, избирательно действующих на каждый из типов изорецепторов с целью достижения желаемого регуляторного эффекта. Необходимым условием для реализации такого подхода является более полное, чем это имеет место сегодня, представление о функциональной роли соответствующей рецепторной популяции и структурной топохимии их узнающего центра.

Еще один аспект фундаментальных и прикладных исследований глутаматных рецепторов касается иммунохимической «анатомии» наиболее важных антигенов головного мозга, особенно мозга человека. В этом плане сделаны лишь первые шаги. Совокупность этих данных дает возможность решить проблемы пространственной локализации глутаматных рецепторов как в структурах головного мозга, так и их топографии на мембране одного нейрона.

Анализ иммунохимических свойств глутаматных рецепторов, их локализации в структурах головного мозга, участвующих в механизмах патогенеза эпилепсии, свидетельствует в пользу перспективности использования глутаматных рецепторов ЦНС в качестве одного из информативных показателей структурно-функци-

ональных поражений возбуждающих путей в головном мозгу больного человека. Можно представить, что механизмы многих заболеваний ЦНС, в том числе и эпилепсии, имеют под собой более сложные, чем это ранее предполагалось, процессы, которые затрагивают не только конкретные химические реакции в головном мозгу, но и вовлекаются в общий метаболизм, происходящий в организме больного человека. В этом плане представляется перспективным исследование целостности элементов гематоэнцефалического барьера и изучение иммунных реакций организма на деструкцию нейронов и их мембранных компонентов.

Наконец, нельзя умолчать об одной из быстро развивающихся областей биохимии нейрорецепторов — генно-инженерных исследованиях. В литературе появились первые данные, касающиеся изучения механизмов синтеза и встраивания рецепторных белков путем выделения их мРНК и трансляции их в модельных системах. Перспективным представляется поиск и выделение генов, создание банка кДНК, кодирующих синтез этих мембранных белков. Открываются совершенно уникальные возможности для анализа генов нейрорецепторов, в том числе глутаматных рецепторов, мозга человека. Дальнейшие исследования в этом направлении могут оказаться полезными, с одной стороны, для выяснения механизмов взаимосвязи генома нервной клетки с ее функцией и, с другой — для разработки новых способов диагностики и лечения заболеваний мозга человека.

Установление практической значимости глутаматных рецепторов для выяснения механизмов нервно-психических заболеваний — это не единственное, что представляет интерес для медицины. Появились уже конкретные примеры использования разных антагонистов глутаматных рецепторов против явления укачивания, некоторых производных глутамата — при токсическом действии высоких парциальных давлений кислорода. Ряд сильных антагонистов глутаматных рецепторов могут быть полезны с лечебной целью при инсультах. Кроме того, эти антагонисты могут составить основу для создания малотоксичных инсектицидных препаратов для сельского хозяйства.

Современное положение науки о мозге таково, что оно не может развиваться дальше без достаточно полного знания нейробиохимических механизмов взаимодействия разных клеточных элементов в нервной ткани. Существование общих принципов функционирования головного мозга на макроуровне (система), микроуровне (популяция нейронов) и молекулярном уровне (популяция нейрорецепторов) позволяет начать сопоставление данных, полученных аналитическим и интегративным путем. Агонисты и антагонисты глутаматных рецепторов, моноклональные антитела к ним являются наиболее удобным инструментом современного поиска одного из типов биохимических коррелятов, которые могут лежать в основе конкретных механизмов деятельности мозга человека.

ЛИТЕРАТУРА

- Аврова Н. Ф., С...
менные предст...
дах // Усп. сов...
№ 1. С. 33—47.
- (Акоев Г. М. и др.)
nov G. N., Vol...
as possible neu...
Ampullae of Lor...
Neurosci. Lett...
P. 307—312.
- Ашмарин И. П. Г...
ческого примен...
фундаментальны...
лых регуляторны...
мед. химии. 1984.
- Ашмарин И. П. С...
биохимической с...
мики головного...
и механизмы д...
человека. Л., 1983.
- Ашмарин И. П. Гп...
вании новой вы...
иерархии регулят...
Нейрохимия. 1987.
- Ашмарин И. П., Об...
ляторные пептид...
нально непрерывн...
ния. 1986. Т. 51, J...
Ата-Муратова Ф. А.
ческие предпосыл...
отражения // Систе...
лемы генетики м...
С. 24—35.
- Ата-Муратова Ф. А.
Некоторые проблем...
и его системной...
модели культуры н...
Успехи физиол. на...
№ 1. С. 32—55.
- Бессиди В. И., Кузнец...
бинова С. А. Молек...
зация глутаматчувств...
возбуждаемых мембр...
Изучение функци...
ющих мембран
- С. А. Дамбинова

ЛИТЕРАТУРА

- Аврова Н. Ф., Обухова Е. Л. Современные представления о ганглиозидах // Усп. совр. биол. 1975. Т. 79, № 1. С. 33—47.
- (Акоев Г. М. и др.) Akoev G. M., Andrianov G. N., Volpe N. O. L-glutamate as possible neurotransmitter in the Ampullae of Lorenzini of the Skate // Neurosci. Lett. 1980. Vol. 20, N 3. P. 307—312.
- ✓ Ашмарин И. П. Перспективы практического применения и некоторых фундаментальных исследований малых регуляторных пептидов // Вопр. мед. химии. 1984. Т. 30, № 3. С. 2—7.
- Ашмарин И. П. Особенности общей биохимической статистики и динамики головного мозга // Принципы и механизмы деятельности мозга человека. Л., 1985. С. 26—27.
- Ашмарин И. П. Гипотеза о существовании новой высшей категории иерархии регуляторных пептидов // Нейрохимия. 1987. Т. 6, № 1. С. 23—28.
- Ашмарин И. П., Обухова М. Ф. Регуляторные пептиды как функционально непрерывные серии // Биохимия. 1986. Т. 51, № 4. С. 453—465.
- Ата-Муратова Ф. А. Мозг и биологические предпосылки высших форм отражения // Системогенез и проблемы генетики мозга. М., 1983. С. 24—35.
- Ата-Муратова Ф. А., Зазулин С. В. Некоторые проблемы генетики мозга и его системной организации на модели культуры нервной ткани // Успехи физиол. наук. 1981. Т. 12, № 1. С. 32—55.
- Беседин В. И., Кузнецов А. С., Дамбинова С. А. Молекулярная организация глутаматчувствительных хемовозбудимых мембран нервных клеток. Изучение функции глутаматсвязывающих мембранных белков мозга методом встраивания в липосомы // Биохимия. 1985. Т. 50, вып. 3, № 1. С. 363—367.
- Беседин В. И. Исследование физико-химических характеристик глутаматсвязывающих мембранных белков ЦНС и их функции в протеолипосомах: Дис. ... канд. биол. наук. Л., 1987.
- Бехтерева Н. П. Здоровый и больной мозг человека. Л., 1980. 207 с.
- Бурлакова Е. В., Джалябова М. И., Гвахария В. О., Глущенко Н. Н., Молочкина Е. М., Штолько В. Н. // Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. М., 1982. С. 113—140.
- Вартанян М. Е., Лидеман Р. Р., Дмитриев А. Д., Теннов А. В. Участие эндогенных опиатов в регуляции физиологических функций // Система мозговых и внемозговых пептидов. Тез. докл. симп. Л., 1984. С. 25—26.
- Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В., Мевх А. Т. Физико-химические исследования молекулярных механизмов действия физиологически активных соединений: Рецепция. // Итоги науки и техники. М., 1985. Т. 3. С. 1—159.
- Вульфнус Е. А., Коваленко В. А. Холинорецепторы // Итоги науки и техники. М., 1978. Т. 8. 100 с.
- Гапон С. А., Самойлова М. В. Уменьшение проводимости мембраны изолированных нейронов при действии медиаторных веществ у моллюска *Planorbis corneus* // Журн. эвол. биохим. физиол. 1982. Т. 1—18, № 5. С. 535—539.
- Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов. М., 1978. 325 с.
- Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Молекулярные механизмы патогенеза эпилептической активности // Успехи

физиол. наук, 1983. Т. 14, № 1. С. 102—119.

Годухин О. В., Жарикова А. Д., Буданцев А. Ю. Механизмы регуляции глутаматергической синаптической передачи в центральной нервной системе позвоночных // Успехи совр. биол. 1983. Т. 95, № 3. С. 383—397.

Городинский А. И. Факторы регуляции глутаматных рецепторов головного мозга: Дис. ... канд. биол. наук. Л., 1985.

Городинский А. И., Дамбинова С. А. Влияние ионов Na^+ и Ca^{2+} на специфическое связывание L^3H -глутамата с мембранами нервных клеток // Нейрохимия. 1985. Т. 4, № 1. С. 180—185.

Городинский А. И., Дамбинова С. А. Выделение и частичная очистка эндогенного ингибитора рецепторного связывания L^3H -глутамат // Бюл. exper. биол. и мед. 1986. Т. 52, № 9. С. 285—287.

Гришин Е. В., Волкова Т. М., Арсеньев А. С., Решетов О. С., Оноприенко В. В., Магазаник Л. Г., Антонов С. М., Федорова И. М. Структурно-функциональная характеристика аргиопина — блокатора ионных каналов из яда паука *Argiope lobata* // Биоорг. химия. 1986. Т. 12, № 8. С. 1121—1124.

Гуревич В. С. Таурин и функция возбудимых клеток. Л., 1986. 109 с.

Дамбинова С. А. Глутаматные рецепторы ЦНС: организация и функции // Нейрохимия. 1983. Т. 2, № 4. С. 426—440.

Дамбинова С. А., Беседин В. И. Выделение и очистка синаптических белков, специфически связывающих L -глутамат, из мембран головного мозга крыс // Нейрохимия. 1982. Т. 1, № 4. С. 543—549.

Дамбинова С. А., Беседин В. И., Городинский А. И., Павлова О. И., Маргулис М. Н. Функция глутаматных рецепторов в мембранных везикулах, протеолипосомах и клетках нейробластомы N 18Tg2a // Физиол. журн. СССР, 1984а. Т. 70, № 7. С. 952—960.

Дамбинова С. А., Беседин В. И., Демина М. Н. Молекулярная организация глутаматчувствительных хемовозбудимых мембран нервных клеток: Физико-химические характеристики очищенных глутаматсвязывающих мембранных белков // Биохимия. 1984б. Т. 49, № 2. С. 216—222.

Дамбинова С. А., Городинский А. И. Связывание L^3H -глутамата с синаптическими мембранами, выделенными из коры и гиппокампа крыс КМ // Бюл. exper. биологии и медицины. 1982. Т. 47, № 12. С. 58—59.

Дамбинова С. А., Городинский А. И. Молекулярная организация глутаматчувствительных хемовозбудимых мембран нервных клеток. Связывание L -глутамата с синаптическими мембранами // Биохимия. 1984а. Т. 49, № 1. С. 67—74.

Дамбинова С. А., Городинский А. И., Лекомцева Т. М., Корешонков О. Н. Молекулярная организация глутаматчувствительных хемовозбудимых мембран нервных клеток. Сравнительный анализ свойств глутаматсвязывающих мембранных белков, выделенных из коры головного мозга крыс и человека // Биохимия. 1987а. Т. 52, вып. 10. С. 1642—1647.

Дамбинова С. А., Лекомцева Т. М., Маргулис М. Н., Огурцов Р. П. Молекулярная организация глутаматчувствительных хемовозбудимых мембран нервных клеток. Анализ глутаматсвязывающих мембранных белков с помощью моноклональных антител // Биохимия. 1987б. Т. 52, вып. 9. С. 1523—1530.

Дамбинова С. А., Сурнина М. В., Павлова О. И. Иммунохимический анализ структурной организации глутаматных рецепторов ЦНС // Вопросы структурной и медиаторной организации ЦНС. Л., 1985. С. 56—62.

Дамбинова С. А., Хромов-Борисов Н. В. Применение метода Фишера к анализу структуры глутаматных рецепторов ЦНС // Докл. АН СССР. 1983. Т. 274, № 2. С. 467—470.

Думлер И. Л., Этингоф Р. Н. Субъединичная структура цГМФ фосфодиэстеразы наружных сегментов палочек сетчатки // Докл. АН СССР. 1981. Т. 260, № 6. С. 1477—1481.

Захарова Л. И., Осадчая Л. М. Роль свободных аминокислот в метаболизме головного мозга // Проблемы биохимии: Нервная система. Л., 1978. С. 103—119.

Игнатова Т. Н. Трансформация клеток // Биология клетки в культуре. Л., 1984. С. 101—194.

Карлов В. А., Стефани Д. В., Помогаева М. В., Виноградова Т. В., Коротич В. А., Козлов С. А. Содержание циркулирующих иммунных комплексов в крови при эпилепти-

- ческих припадках в клинике и эксперименте // Журн. невропатол. и психиатр. 1985. Т. 85, вып. 6. С. 833—837.
- Кискин Н. И.** Глутамат-активируемые ионные токи в мембране изолированных нейронов гиппокампа: Дис. ... канд. биол. наук. Киев, 1987.
- [**Кискин Н. И.** и др.] **Kiskin N. I., Krishtal O. A., Tsyndrenko A. Ya.** Excitatory amino acid receptors in hippocampal neurons: kainate fails to desensitize them // *Neurosci. Lett.* 1985. Vol. 63, N 3. P. 225—230.
- Кискин Н. И., Крышталь О. А., Цындренко А. Я.** Рецепторы возбуждающих аминокислот в мембране пирамидных нейронов гиппокампа // *Биол. мембраны*, 1986. Т. 3, № 9. С. 909—919.
- Кискин Н. И., Цындренко А. Я.** L-Глутаматактивируемая проводимость крысы // *Нейрофизиология*. 1985. Т. 17, № 4. С. 558—560.
- Кияткин Е. А., Кольдиц М.** Функциональные перестройки хемочувствительности центральных нейронов // *Успехи физиол. наук*. 1986. Т. 17, № 3. С. 108—127.
- Клуша В. Е.** Пептиды — регуляторы функций мозга. Рига, 1984. 181 с.
- Коломыткин О. В., Абрисимов Б. С., Чистякова Л. Г., Кузнецов В. И.** Встраивание фрагментов мембран из глутаматных и ГАМКовых синапсов в плоскую фосфолипидную мембрану // *Матер. I Всесоюз. биофиз. съезда*. М., 1982. Т. 1. С. 241.
- Костюк П. Г., Крышталь О. А.** Механизмы электрической возбудимости нервной клетки. М., 1981. 204 с.
- Комиссаров И. В.** Аллостерические, неконкурентные и независимые модуляторы рецепторно-канальных ансамблей // *Фармакология и токсикология*. 1985. № 5. С. 5—13.
- Комиссаров И. В.** Механизмы химической чувствительности синаптических мембран. Киев, 1986. 239 с.
- Коштыяц О. Х., Эйкел М., Куликов М. А., Маркова М. Ю.** Влияние стимуляции locus coeruleus на хемореактивные свойства нейронов гиппокампа // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1982. № 6. С. 942—947.
- Кричевская А. А., Лукаш А. И., Шугалей В. С., Бондаренко Т. И.** Аминокислоты, их производные и регуляции метаболизма. Ростов-на-Дону, 1983. 112 с.
- Кругликов Р. И.** Нейрохимические механизмы обучения и памяти. М., 1981. 211 с.
- Кузнецов В. И., Коломыткин О. В., Ермишкин Л. Н.** Выделение частично очищенного рецептора глутамата и его изучение на бислойных фосфолипидных мембранах // *Биофизика сложных систем и радиационных нарушений*. М., 1977. С. 29—33.
- Крыжановский Г. Н., Глебов Р. Н.** Пептиды мозга и эпилептическая активность // *Журн. невропатологии и психиатрии*. 1983. Т. 83, № 6. С. 918—925.
- Крышталь О. А., Кискин Н. И., Ключко Е. М., Осипчук Ю. В., Цындренко А. Я.** Аминокислотные рецепторы изолированных нейронов ЦНС млекопитающих // *Рецепторы и ионные каналы: Тез. симп. Ташкент*, 1986. С. 59—60.
- Крышталь О. А., Марченко С. М., Пидопличко В. И.** Рецептор АТФ в мембране сенсорных нейронов // *Докл. АН СССР*. 1982. Т. 267, № 5. С. 1244—1247.
- Кудряшова Н. И., Городинский А. И., Дамбинова С. А.** Синтез сдвоенных производных глутаминовой кислоты и их влияние на рецепторное связывание L-³H-глутамата // *Химико-фармацевт. журн.* 1987. Т. 21, № 6. С. 655—660.
- (**Лапин И. П.**) **Lapin I. P.** Endogenous antagonists of quinolinic acid and kynurenine as links of the defensive mechanisms in epilepsy // *Acta Neurologica*. 1985. Vol. 7, N 3/4. P. 203—206.
- Левин С. Л., Сытинский И. А.** Токсическое действие каиновой кислоты как модель хореи Гентингтона и эпилепсии // *Журн. невропатологии и психиатрии*. 1983. Т. 84, вып. 5. С. 754—762.
- Лейбуш Б. Н., Бондарева В. М.** Модуляция свойств инсулинового рецептора плазматических мембран анти-телами к гормону // *Тез. I Всесоюз. биофиз. съезда*. М., 1982. Т. IV. С. 124.
- Магазаник Л. Г.** Функциональная организация холинорецептивных постсинаптических мембран // *Структура и функции биологических мембран*. М., 1975. 345 с.
- Магазаник Л. Г., Антонов С. М., Гмиро В. Е.** Механизмы активации и блокирования постсинаптической мембраны, чувствительной к глутамату // *Биол. мембраны*. 1984. Т. 1, № 2. С. 130—140.

- Магазаник Л. Г., Антонов С. М., Волкова Т. М., Гришин Е. В., Федорова И. М. Аргиопин — природный блокатор ионных каналов, активируемых глутаматом // Рецепторы и ионные каналы: Тез. докл. симп. Ташкент, 1986. С. 25—26.
- ✓ Малашиха Ю. А. Иммунный барьер мозга: иммунология и иммунопатология спинномозговой жидкости. М., 1986. 160 с.
- ✓ Мандельштам Ю. Е., Наследов Г. А. Функциональные особенности локаторных мышц саранчи // Нейрофизиология. 1977. Т. 9, № 5. С. 532—536.
- Мандельштам Ю. Е. Нейрон и мышца насекомого. Л., 1983. 169 с.
- Маргулис М. Н., Гапон С. В., Кудряшова Н. И., Дамбинова С. А. Действие сдвоенных производных глутаминовой кислоты на нейроны моллюска *Planorbis corneus* // Нейрофизиология. 1988. Т. 20, № 1. С. 137—139.
- Микеладзе Д. Г. Молекулярная организация рецепторных белков, механизмы посттрансляционной модификации и проблемы памяти // Нейрохимия. 1986. Т. 5, № 2. С. 211—216.
- ✓ Михельсон М. Я. Сравнительная и эволюционная фармакология // Успехи физиол. наук. 1977. Т. 8, № 3. С. 3—27.
- Михельсон М. Я., Зеймаль Э. В. Ацетилхолин: О молекулярном механизме действия. Л., 1970. 279 с.
- ✓ Панченко Л. Ф., Герасимов Л. М., Антоненков В. Д. Роль пероксисом в патологии клетки. М., 1981. 207 с.
- Перцева М. Н. Циклический аденозинмонофосфат и ионы кальция в механизме действия катехоламинов // Успехи совр. биологии. 1976. Т. 82, в. 1(4). С. 18—33.
- Перцева М. Н. Мембранный комплекс гормонорецептор-аденилатциклаза и его функциональное формирование в онтогенезе // Успехи совр. биологии. 1982. Т. 93, № 3. С. 382—396.
- ✓ Пиотровский Л. Б. Возбуждающие аминокислоты и их антагонисты: Структура и активность // Хим.-фарм. журн. 1987, № 7. С. 773—782.
- Пиотровский Л. Б., Думпис М. Н., Иоффе В. Д., Городинский А. И., Дамбинова С. А. Влияние N-, O-замещенных производных глутаминовой и аспарагиновой аминокислот на рецепторное связывание L-³H-глутамата // Докл. АН СССР. 1986. Т. 286, № 1. С. 235—238.
- Погодаев К. И. Эпилептология и патохимия мозга. М., 1986. 288 с.
- Поздеев В. К. Медиаторные процессы и эпилепсия. Л., 1983. 112 с.
- Полетаев А. Б., Селифанова О. П., Бова И. Я. Исследование аутоиммунных процессов нервно-психических заболеваний с помощью количественного иммуноферментного анализа // Иммунология. 1985. Т. 4, № 2. С. 75—76.
- Полетаев А. Б., Селифанова О. П., Бова И. Я. К вопросу об органной специфичности белков группа S-100: Иммуногистохимический анализ // Иммунология. 1986. Т. 5, № 2. С. 86—88.
- Полетаев А. Б., Селифанова О. П., Бова И. Я. Физико-химические характеристики видонеспецифичных белков антигенов мозга, являющихся мишенями аутоантител при некоторых нервно-психических заболеваниях // Нейрохимия. 1987. Т. 6, № 4. С. 572—580.
- Попов Ю. Г., Городинский А. И. Высокоаффинные участки связывания L-³H-глутаминовой кислоты в тромбоцитах человека // Материалы Всесоюз. совещания по физиологии и биохимии глутаматергических нейронов. Л., 1987. С. 26.
- ✓ Раевский К. С., Георгиев В. П. Медиаторные аминокислоты. М., 1986. 240 с.
- Разумовская Н. И., Дамбинова С. А., Демина М. Н., Куликова О. Г., Говорова Л. В. О возможном участии ионов Ca²⁺ в регуляции синтеза РНК в ткани мозга // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1981. Т. 46, № 6. С. 677—679.
- Семенов С. Ф., Назаров К. Н., Чуприков А. П. Аутоиммунные процессы при врожденных энцефалопатиях, эпилепсии и шизофрении. М., 1973. 336 с.
- Семенов С. Ф., Семенова К. А. Иммунобиологические основы патогенеза нервных и психических заболеваний. Ташкент, 1984. 336 с.
- ✓ Сергеев Н. В., Шимановский Н. Л. Рецепторы физиологически активных веществ. М., 1987. 400 с.
- Скок В. И. Локализация и строение участков связывания бис-аммониевых соединений в никотиновом холинорецепторе // Биол. мембраны. 1985. Т. 2, № 3. С. 245—255.
- Сологуб М. И., Кокарев А. А., Завад-

- ская Л. Н. О полимодальности входов нервной клетки // Тез. I Всесоюз. биофиз. съезда. М., 1982. Т. 2. С. 104.
- Судаков К. В. Системные механизмы эмоционального стресса. М., 1981. 232 с.
- Судаков К. В. Системное квантование поведения // Успехи физиол. наук. 1983. Т. 14, № 1. С. 3—26.
- Судаков К. В. Олигопептиды в механизмах эмоциональных состояний // Вопр. мед. химии, 1984. Т. 30, в. 3. С. 15—23.
- (Ташмухамедов Б., Усманов П. Б., Казаков И. и др.) Tashmukhamedov B., Usmanov P. B., Kazakov I., Kalikulow D., Yukelson L. Ya., Atakuziev B. Effects of different spider venoms on artificial and biological membranes // Toxins as Tool in Neurochemistry / Eds. F. Hucho, Y. Ovchinnikov. Berlin; New York, 1983. P. 312—323.
- Ташмухамедов Б. А., Махмудова Е. М., Усманов П. Б., Казаков И., Атакузиев Б. У. Выделение глутаматного рецептора насекомых и встраивание его в бислойные мембраны // Узб. биол. журн. 1983, № 6. С. 57—58.
- Ташмухамедов Б. А., Махмудова Э. М., Усманов П. Б., Казаков И., Атакузиев Б. У. Выделение и реконструкция глутаматных рецепторов на бислойных липидных мембранах // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276, № 4. С. 977—979.
- (Ташмухамедов Б., Махмудова Е., Усманов П. и др.) Tashmukhamedov B., Makhmudova E., Usmanov P., Kazakov I. Reconstitution in bilayer lipid membranes of the crab Potamon transcaespum spider venom sensitive glutamate receptors // Gen. Physiol. Biophys. (USSR). 1985. Vol. 4, N 6. P. 625—630.
- Фринляндская И. И. Постоянные клеточные линии, дифференцирующиеся in vitro // Биология клетки в культуре. Л., 1984. 280 с.
- Фукс Б. Ф., Сидорович И. Г., Игнатьева Г. А. Гибридомы и моноклональные антитела // Журн. Всес. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1982. Т. 27, № 4. С. 409—416.
- Хромов-Борисов Н. В. Ацетилхолин и структура рецепторов // Краткий курс молекулярной фармакологии. М., 1975. С. 113—143.
- Шаповалов А. И., Ширяев Б. И. Передача сигналов в межнейронных синапсах. Л. 1987. 173 с.
- Шматько В. Г., Кветкова Э. В., Ереинев С. И. Клинико-иммунологические корреляции при эпилепсии // Журн. невропатологии и психиатрии. 1984. Т. 84, в. 6. С. 814—819.
- Штарк М. Б. Иммунонейрофизиология. М., 1978. 215 с.
- Штарк М. Б. Мозгоспецифические белки (антигены) и функции нейрона. М., 1985. 319 с.
- Цыдренко А. Я. Сравнительный анализ характеристик калиевых каналов в мембране нейронов спинальных ганглиев и клеток нейробластомы // Нейрофизиология. 1980. Т. 12, № 2. С. 208—210.
- Этингоф Р. Н. Эволюционные аспекты участия циклических нуклеотидов в первичных механизмах трансформации сенсорных систем // Морфофункциональные эволюционные аспекты сенсорных систем. Л., 1987. С. 132—148.
- Aarli J. A., Tönder O. Immunological aspects of neurological diseases. Basel; New York, 1980. 189 p.
- Adams P. R. Acetylcholine receptor kinetics // J. Membr. Biol. 1981. Vol. 58, N 3, P. 161—174.
- Adrian E. D. The spread of activity in the cerebral cortex // J. Physiol. 1935. Vol. 88. P. 127—161.
- Amino acid neurotransmitters // Eds. F. V. De Feudis, P. Mandel. New York, 1981. 752 p.
- Balkar K. J., Johnston G. A. R. Glutamate uptake by brain slices and its relation to the depolarization of neurones by acidic amino acids // J. Neurobiol. 1972. Vol. 3, N 4. P. 95—301.
- Barber S. B. Responses of Limulus chemoreceptors to amino acid stimulation // Am. Zool. 1961. Vol. 1, N 2. P. 435—439.
- Bardsley M. E., Roberts P. J. Molecular size of the high-affinity glutamate-binding site on synaptic membranes from rat brain // Biochem. Biophys. Res. Com. 1985. Vol. 126, N 1. P. 227—232.
- Barker J. L., McBurney R. N., Macdonald J. F. Fluctuation analysis of neutral amino acid responses in cultured mouse spinal neurones // J. Physiol. 1982. Vol. 322. P. 365—387.
- Baron J. C., Roeda D., Munari C., Crouzel C., Chodwicz J. P., Comar D. Brain regional pharmacokinetics of ¹⁴C-labeled diphenylhydantoin;

- positron emission tomography in humans // *Neurosci. Behav. Physiol.* 1983. Vol. 33, N 5. P. 580—585.
- Baron J. C., Comar D., Larifian E., Agid Y., Crouzel C., Loo H., Deniker P., Kellerschohn C. Dopaminergic receptor sites in human brain: PET // *Neurology*. 1985. Vol. 35, N 1. P. 16—24.
- Barrantes F. J. The nicotinic cholinergic receptor different compositions evidenced by statistical analysis // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1975. Vol. 62, N 2. P. 407—414.
- Bassanini M., Baez A., Sotelo J. Immunoglobulins in epilepsy // *J. Neurol. Sci.* 1982. Vol. 56, N 2—3. P. 275—281.
- Baud J., Fagg G. E. Glutamate-containing dipeptides do not modulate ligand binding at excitatory amino acid receptors // *Neurosci. Lett.* 1986. Vol. 70, N 2. P. 228—233.
- Baudry M., Arst D., Oliver M., Lynch G. Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus // *Developm. Brain Res.* 1981. Vol. 1, N 1. P. 37—48.
- Baudry M., Kramer K., Fagni L., Recasens M., Lynch G. Classification and properties of acidic amino acid receptors in hippocampus: II. Biochemical studies using a sodium efflux assay // *Mol. Pharmacol.* 1983a. Vol. 24, N 2. P. 222—228.
- Baudry M., Kramer K., Lynch G. Classification and properties of acidic amino acid receptors in hippocampus: III. Supersensitivity during the postnatal period and following denervation // *Mol. Pharmacol.* 1983b. Vol. 24, N 2. P. 229—234.
- Baudry M., Lynch G. Regulation of glutamate receptors by cations // *Nature*. 1979. Vol. 282, N 5740. P. 748—750.
- Baudry M., Lynch G. Regulation of hippocampal glutamate receptors: evidence for the involvement of a calcium-activated protease // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1980a. Vol. 77, N 4. P. 2298—2302.
- Baudry M., Lynch G. Hypothesis regarding the cellular mechanism responsible for long-term synaptic potentiation in the hippocampus // *Exp. Neurol.* 1980b. Vol. 68, N 1. P. 202—204.
- Baudry M., Lynch G. Characterization of two ^3H -glutamate binding sites in rat hippocampal membranes. // *J. Neurochem.* 1981a. Vol. 36, N 3. P. 5—18.
- Baudry M., Lynch G. Hippocampal glutamate receptors // *Mol. Cell. Biochem.* 1981b. Vol. 38, N 3. P. 5—18.
- Baudry M., Oliver M., Greager R., Kieraszkowski A., Lynch G. Decrease in glutamate receptors following repetitive electrical stimulation in hippocampal slices // *Life Sci.* 1980. Vol. 27, N 4. P. 325—329.
- Baudry M., Smith E., Lynch G. Influence of temperature, detergents and enzymes on glutamate receptor binding and its regulation by calcium in rat hippocampal membranes // *Mol. Pharmacol.* 1981. Vol. 20, N 3. P. 280—286.
- Bauer U., Dudel J., Hatt H. Characteristics of single chemoreceptive units sensitive to amino acids and related substances in the crayfish leg // *J. Comp. Physiol.* 1981. Vol. 144, N 1. P. 67—74.
- Ben-Ari Y. Epilepsy: Changes in local glucose consumption and brain pathology produced by kainic acid // *Glutamate as neurotransmitter* / Eds. G. DiChiara, G. L. Gessa. New York, 1981. P. 385—394.
- Bernstein J., Fisher R., Zaczek R., Coyle J. Dipeptides of glutamate and aspartate may be endogenous neuroexcitants in the rat hippocampal slice // *J. Neurosci.* 1985. Vol. 5, N 6. P. 1429—1433.
- (Betz H., Becker K. M., Grenningloh G.) Бетц Х., Беккер К. М., Греннинглох Г., Гундельфингер Е., Герман-Бормейер И., Рем Х., Ринигц А., Шлосс П., Шмидт Р., Шмидт Б., Заврус Е. Биохимия и молекулярная биология рецепторов и ионных каналов ЦНС // *Рецепторы и ионные каналы*. Ташкент, 1986. С. 5.
- Biziere K., Thompson H., Coule J. T. Characterization of specific high affinity binding sites for $\text{L-}^3\text{H}$ -glutamate in rat brain membranes // *Brain Res.* 1980. Vol. 183, N 2. P. 421—433.
- (Bradbury M.) Бредбери М. Концепция гемато-энцефалического барьера. М., 1983. 480 с.
- Bradford H. F., McIlwain H. Ionic basis for the depolarization of cerebral tissues by excitatory acidic amino acids // *J. Neurochem.* 1966. Vol. 13, N 11. P. 1163—1177.
- Brennan M., Cantrill R. C., Warner S. J. C., Van der Westhuyzen, Fernandes-Costa F., Kramer S., Metz J. Amino acid transmitter receptor binding in synaptic membranes

- from normal and vitamin B₁₂ deficient fruit bates // *Brain Res.* 1981. Vol. 219, N 1. P. 186—189.
- Briley P. A., Fibbin M. R., Lunt G. G., Turner P. D.** Glutamate receptor binding in insects and mammals // *Mol. Cell. Biochem.* 1981. Vol. 38/39, N 4. P. 347—356.
- Bromberg M. B., Penney J. B., Stephenson B. S., Young A. B.** Evidence for glutamate as the neurotransmitter of corticothalamic and corticorubral pathways // *Brain Res.* 1981. Vol. 215, N 1—2. P. 369—374.
- Campochiaro P., Coyle J. T.** Ontogenetic development of kainate neurotoxicity: Correlates with glutamatergic innervation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1978. Vol. 75, N 4. P. 2025—2029.
- Carlyle R. F.** The occurrence in and actions of amino acids on isolated supraoral sphincter preparation of the sea anemone, *Actinia equina* // *J. Physiol. London.* 1974. Vol. 236. P. 635—658.
- Carpio J., Byrd R. P.** Electrophysiological evidence for acidic, basic and neutral amino acid olfactory receptor sites in catfish // *J. Gen. Physiol.* 1984. Vol. 84, N 3. P. 403—422.
- Carthwaite J., Balaze R.** Supersensitivity to the cyclic GMP response to glutamate during cerebellar maturation // *Nature.* 1978. Vol. 275, N 5678. P. 328—329.
- Carthwaite J., Balaze R.** Excitatory amino acid induced changes in cyclic GMP levels in slices and cell suspensions from the cerebellum // *Glutamate as a Neurotransmitter. Adv. Biochem. Psychopharm. / Eds. G. DiChiara, G. L. Gessa. New York, 1981. Vol. 27. P. 317—326.*
- Carthwaite J., Carthwaite G., Hajos F.** Ionic requirements for neurotoxic effects of excitatory amino acid analogues in Rat cerebellar slices // *Neurosci.* 1986a. Vol. 18, N 2. P. 437—448.
- Carthwaite J., Carthwaite G., Hajos F.** Amino acid neurotoxicity: Relationship to neuronal depolarization in Rat cerebellar slices // *Neurosci.* 1986b. Vol. 18, N 2. P. 449—460.
- Chang M. H., Michaelis E. K.** Effects of L-glutamate on synaptosomal and synaptic membrane Na⁺ fluxes and (Na⁺—K⁺)-ATPase // *J. Biol. Chem.* 1980. Vol. 255, N 6. P. 2411—2417.
- Chang M. H., Michaelis E. K.** L-Glutamate stimulation of Na⁺ efflux from brain synaptic membrane vesicles // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256, N 19. P. 10084—10087.
- Changeux J.-P., Heidmann T., Popt Y. L., Sobel A.** Functional properties of the acetylcholine receptor protein // *Neurochem. Int.* 1980. Vol. 2, N 2. P. 219—231.
- Chapman A., Keane P. E., Meldrum B. S., Simiand J., Vernieres J. C.** Mechanism of anticonvulsant action of valproate // *Progr. Neurobiol.* 1982. Vol. 19, N 4. P. 315—359.
- Charles A. K., Chang Y.-F.** Effect of D- and L-amino adipate on the efflux of L-aspartate, L-glutamate and γ -aminobutyrate from superfused rat brain slices // *Brain Res.* 1983. Vol. 259, N 2. P. 331—334.
- Coutinho-Netto J., Abdul-Ghami A. S., Collins J. E., Bradford H. F.** Is glutamate a trigger factor in epileptic hyperactivity? // *Epilepsia.* 1981. Vol. 22, N 3. P. 289—296.
- Cox D. W. G.** Lack of effect of excitatory amino acids on endogenous cyclic AMP levels in rat cerebro-cortical tissue in vitro // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1977. Vol. 75, N 1. P. 51—55.
- Coyle J. T.** Neurotoxic action of kainic acid // *J. Neurochem.* 1983. Vol. 41, N 1. P. 1—11.
- Croucher M., Collins J. F., Meldrum B. S.** Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists // *Science.* 1982. Vol. 216, N 4548. P. 899—901.
- Cull-Candy S. G., Miledi R., Parker I.** Single glutamate-activated channels recorded from locust muscle fibres with perfused patch-clamp electrodes // *J. Physiol.* 1981. Vol. 321. P. 195—210.
- Cull-Candy S. G., Miledi R.** Properties of miniature excitatory junctional currents at the locus nerve-muscle junction // *J. Physiol.* 1982. Vol. 326. P. 527—551.
- Curtis D. R.** Problems in the evaluation of glutamate as a central nervous system transmitter // *Glutamic Acid. Adv. Biochem. and Physiol. / Eds. L. J. Filer et al. New York, 1979. P. 163—175.*
- Curtis D. R., Johnston G. A.** Amino acid transmitters in mammalian central nervous system // *Ergebn. Physiol.* 1981. Vol. 69, N 2. P. 94—188.
- Curtis D. R., Phillis J. W., Watkins J. C.** The chemical excitation of spinal neurons by certain amino acids // *J. Physiol.* 1959. Vol. 150. P. 656—682.

- Curtis D. ., Watkins J. C. The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids // *J. Physiol.*, 1960. Vol. 150, N 3. P. 656—682.
- Curtis D. R., Phillis J. W., Watkins J. C. Actions of amino acids on the isolated hemisected spinal cord of the toad // *Brit. J. Pharmacol.* 1961. Vol. 16, N 2. P. 269—283.
- Davis L. G., Cohen R. K. Identification of an endogenous peptide-ligand benzodiazepine receptor // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980. Vol. 92, N 1. P. 141—148.
- Davies J., Watkins J. C. Selective antagonism of amino acid induced and synaptic excitation in the cat spinal cord // *J. Physiol.* 1979. Vol. 287. P. 621—635.
- Davies J., Watkins J. C. Excitatory amino acid receptors and their role in synaptic excitation in the dorsal horn of the mammalian spinal cord // *Neurotransmitters, seizures, and epilepsy* / Eds. P. L. Morselli et al. New York, 1981. P. 361—367.
- De Barry J., Vincendon G., Gombos H. High affinity glutamate binding during postnatal development of rat cerebellum // *FEBS Lett.* 1980. Vol. 109, N 2. P. 175—179.
- De Barry J., Vincendon G., Gombos G. Uptake and metabolism of L-³H-glutamate and L-³H-glutamine in adult rat cerebellar slices // *Neurochemical Res.* 1983. Vol. 8, N 10. P. 13241—1335.
- De Feudis F. V. Amino acids as central neurotransmitters // *Ann. Rev. Pharmacol.* 1975. Vol. 15. P. 105—130.
- De Franco A. L., Koshland D. E. Multiple methylation in processing of sensory signals during bacterial chemotaxis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1980. Vol. 77, N 5. P. 2429—2433.
- Derby C. D., Atema J. Chemosensitivity of walking legs of the lobster *Homarus americanus*: neurophysiological response spectrum and thresholds // *J. Exp. Biol.* 1982a. vol. 98, N 3. P. 303—315.
- Derby C. D., Atema J. Narrow-spectrum chemoreceptor cells in the walking legs of the lobster *Homarus americanus*: Taste specialists // *J. Comp. Physiol.* 1982b. Vol. 146, N 2. P. 181—189.
- De Robertis E., Fiszer de Plazas S. Isolation of hydrophobic proteins binding neurotransmitter amino acids: Stereoselectivity of the binding of ¹⁴C-glutamic acid in cerebral cortex // *J. Neurochem.* 1976. Vol. 26, N 6. P. 1237—1243.
- (De Robertis E., Fiszer de Plazas S.) Де Роберис Э., Фишер де Плаза С. Выделение гидрофобных белков, связывающих аминокислоты — нейромедиаторы // *Сравнительная фармакология синаптических рецепторов*. Л., 1977. С. 33—42.
- Engel J., Kuhl D. E., Phelps M. E., Rausch R., Nuwer M. Local cerebral metabolism during partial seizures // *Neurology.* 1983. Vol. 33, N 4. P. 400—413.
- Fagg G. E. L-glutamate, excitatory amino acid receptors and brain function // *Trends Neurosci.* 1985. Vol. 8, N 5. P. 207—210.
- Fagg G. E., Foster A. C. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system // *Neurosci.* 1983. Vol. 9, N 4. P. 701—719.
- Fagg G. E., Foster A. C., Harris E. W., Lanthorn T. H., Cotman C. W. Structure-activity relationships of L-glutamate receptor ligands: Role of the ω-acidic terminal // *Neurosci. Lett.* 1982. Vol. 31, N 1. P. 59—64.
- Fagg G. E., Foster A. C., Mena E. E., Cotman C. W. Chloride and calcium ions reveal a pharmacology distinct populations of L-glutamate binding sites in synaptic membranes: Correspondence between biochemical and electrophysiological data // *J. Neurosci.* 1982. Vol. 2, N 7. P. 958—965.
- Fagg G. E., Mena E. E., Monaghan D. T., Cotman C. W. Freezing eliminates a specific population of L-glutamate receptors in synaptic membranes // *Neurosci. Lett.* 1983. Vol. 38, N 2. P. 157—162.
- Fagg G. E., Matus A. Selective association of N-methyl aspartate and quisqualate types of L-glutamate receptor with brain postsynaptic densities // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. Vol. 81, N 6. P. 6876—6880.
- Fagni L., Baudry M., Lynch G. Classification and properties of acidic amino receptors in hippocampus // *J. Neurosci.* 1983. Vol. 3, N 8. P. 1538—1546.
- Farde L., Ehring E., Eriksson L. et al. Substituted benzamides as ligands for visualization of dopamine receptor binding in the human brain positron emission tomography. // *Proc. Nat.*

- Acad. Sci. USA. 1985. Vol. 82, N 4. P. 3863—3867.
- Ferkany J., Zaczek R., Markl A., Coyle J. T.** Glutamate-containing dipeptides enhance specific binding at glutamate receptors and inhibit specific binding at kainate receptors in rat brain // *Neurosci. Lett.* 1984. Vol. 44, N 3. P. 281—286.
- Fisher H. F.** A limiting law relating the size and shape of protein molecules to their composition // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1964. Vol. 51, N 6. P. 1285—1291.
- Fisher H. F., Gross D. G.** Spatial location of aromatic residues in subunits of glutamic acid dehydrogenase // *Fed. Proc.* 1964. Vol. 23, N 2. P. 427.
- Fiszer de Plazas S., De Robertis E.** Isolation of hydrophobic proteins binding neurotransmitter amino acids. Glutamate receptor in the shrimp muscle // *J. Neurochem.* 1974. Vol. 23, N 6. P. 1115—1120.
- Fonnum F., Soreide A., Kræle I., Walker J., Walaas I.** Glutamate in cortical fibers // *Adv. Biochem. Psychopharm.* 1981a. Vol. 27, N 1. P. 29—49.
- Fonnum F., Strom-Mathisen J., Davic I.** Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriatal and corticothalamic fibers in rat brain // *Neurosci.* 1981b. Vol. 6, N 3. P. 863—873.
- Fonnum F.** Glutamate: A neurotransmitter in mammalian brain // *J. Neurochem.* 1984. Vol. 42, N 1. P. 1—11.
- Foster A. C., Fagg G. E.** Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: Their characteristics and relationship to synaptic receptors // *Brain Res.* 1984. Vol. 7, N 2. P. 103—164.
- Foster A. C., Fagg G. E., Harris E. W., Cotman C. W.** Regulation of glutamate receptors: Possible role of phosphatidylserine // *Brain Res.* 1982. Vol. 242, N 2. P. 374—377.
- Foster A. C., Fagg G. E., Menna E. E., Cotman C. W.** L-glutamate and L-aspartate binding to separate sites in rat brain synaptic membranes // *Brain Res.* 1981. Vol. 229, N 1. P. 246—250.
- Foster A. C., Roberts P. J.** High affinity L-³H-glutamate binding to postsynaptic receptor sites of rat cerebellar membranes // *J. Neurochem.* 1978. Vol. 31, N 6. P. 1467—1477.
- Foster A. C., Roberts P. J.** Pharmacology of excitatory amino acid receptors mediating the stimulation of rat cerebellar cyclic GMP levels in vitro // *Life Sci.* 1980. Vol. 27, N 3. P. 215—222.
- (Gaito J.) Гайто Дж.** Молекулярная психобиология. М. 1969. 275 с.
- Gratton K. A. F., Lambert J. J., Ramsey R. R., Usherwood P. N. R.** Non-random openings and concentration-dependent lifetime of glutamate-gated channels in muscle membrane // *Nature.* 1981. Vol. 291, N 5814. P. 423—425.
- Gray W. R., Hartley V.** End-group analysis using dansyl chloride // *Meth. Enzymol.* 1971. Vol. 25. P. 121—138.
- Gregoriadis G.** Liposomes as drug carriers // *Pharmacy Internat.* 1983a. Vol. 4, N 2. P. 33—52.
- (Gregoriadis G.) Грегориадис Г.** Последние достижения в изучении липосом // *Липосомы в биологических системах* / Ред. Г. Грегориадис, А. Аллисон. М., 1983b. С. 366—384.
- Hackstadt T., Williams J. C.** pH-dependence of the *Coxiella burnetti* glutamate transport system // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 154, N 2. P. 598—603.
- Haffke S. C., Seeds N. W.** Neuroblastoma: *E. coli* of neurobiology? // *Life Sci.* 1975. Vol. 16, N 11. P. 1649—1657.
- Häggglund J., Aquilonius S. M., Ecker-näs S. A., Hartvig P., Lundquist H., Gullberg P., Landström B.** Dopamine receptor properties in Parkinson's disease and Huntington's chorea evaluated by positron emission tomography using ¹¹C-N-methylspiperone // *Acta Neurol. Scand.* 1987. Vol. 75, N 1. P. 87—94.
- Hamberger A. C., Chiang C. H., Nylen E. S., Scheff S. W., Cotman C. W.** Glutamate as a CNS transmitter. I. Evaluation of glucose and glutamine as a precursor for the synthesis of preferentially released glutamate // *Brain Res.* 1979. Vol. 168, N 3. P. 513—530.
- Hamberger A. C., Chiang C. H., Sandoval E., Cotman C. W.** Glutamate as a CNS transmitter: II. Regulation of Synthesis in the releasable pool. // *Brain Res.* 1979. Vol. 168, N 3. P. 1531—1540.
- Harrison L. C.** Autoantibodies to neuro-

- endocrine receptors // *Neurosci. Lett.* 1983. Vol. 11, suppl. 2. P. S22.
- Hayashi T., Nagai K.** Action of L-amino acids on the motor cortex of high animals, especially L-amino- γ -oxybutyric acid as the real inhibitory principle in brain // *Proc. XX Int. Physiol. Congr. Brussels*, 1956. P. 410.
- Hayes W. F., Barder S. B.** Peripheral synapses in *Limulus* chemoreceptors // *Comp. Biochem. Physiol.* 1982. Vol. 72A, N 2. P. 287—293.
- Head R. A., Tunncliffe G., Matheson G. K.** Glutamate receptor binding to cat central nervous system membranes // *Can. J. Biochem.* 1980. Vol. 58, N 7. P. 534—538.
- Hedblom M. L., Adler J.** Chemotactic response of *Escherichia coli* to chemically synthesised amino acids // *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 155, N 3. P. 1463—1466.
- Heidmann T., Changeux J.-P.** Structural and functional properties of the acetylcholine receptor protein in its purified and membrane-bound states // *Ann. Rev. Biochem.* 1978. Vol. 47. P. 317—357.
- Heywood R., Worden A. N.** Glutamate toxicity in laboratory animals // *Glutamic Acid. Adv. Biochem. Physiol.* // Eds. L. J. Filler, Jr. et al. New York, 1979. P. 203—216.
- Hollman M., Seitert W.** Gangliosides modulate glutamate receptor binding in rat brain synaptic plasma membranes // *Neurosci. Lett.* 1986. Vol. 6, N 2. P. 133—138.
- Honoré T., Larisden J., Krogsgaard-Larsen P.** Ibotenic acid analogues as inhibitors of ^3H -glutamic acid binding to cerebellar membranes // *J. Neurochem.* 1981. Vol. 36, N 3. P. 1302—1304.
- Honoré T., Neelsen M.** Complex structure of quisqualate sensitive glutamate receptor in rat cortex // *Neurosci. Lett.* 1985. Vol. 54, N 1. P. 27—42.
- Hösli L., Andres P. F., Hösli E.** Ionic mechanisms associated with the depolarization by glutamate and aspartate on human and rat spinal cord in tissue culture // *Pflügers Arch.* 1976. Vol. 363, N 1. P. 43—48.
- (Hucho F., Oberthür W., Lottspeich F.)** Хухо Ф., Обертюр В., Лоттспейх Ф. Ионный канал никотинового рецептора ацетилхолина // *Рецепторы и ионные каналы* : Тез. докл. симп. Ташкент. 1986. С. 3.
- French-Mullen J. M., Koller K., Zaczek R., Coyle J. T., Hori N., Carpenter D. O.** N-acetylaspartyl-glutamate: possible role as the neurotransmitter of the lateral olfactory tract // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1985. Vol. 82, N 11. P. 3897—3900.
- Iwata M., Yamagami S., Baba A.** Cystein sulphonic acid in the central nervous system: specific binding of ^{35}S -cysteic acid to cortical synaptic membranes — an investigation of possible binding sites for cysteine sulphonic acid // *J. Neurochem.* 1982. Vol. 38, N 5. P. 1275—1279.
- James V. A., Walker R. J., Wheal H. V.** Structure-activity studies on an excitatory receptor for glutamate on leech *Retzius* neurons // *Br. J. Pharmacol.* 1980. N 4. P. 711—717.
- Jonston B. R., Atema J.** Narrow-spectrum chemoreceptor cells in the antennules of the American lobster, *Homarus americanus* // *Neurosci. Lett.* 1983. Vol. 41, N 1—2. P. 145—150.
- Johnston B. R., Voigt R., Borroni P. F., Atema J.** Response properties of lobster chemoreceptors: turning of primary taste neurons in walking legs // *J. Comp. Physiol.* 1984. Vol. 155, N 5. P. 593—604.
- Johnston G. A. R.** Chemical neurotoxins as denervation tools in neurology // *Ann. Rev. Neurosci.* 1980. Vol. 3. P. 169—187.
- Johnston G. A. R.** Multiplicity of receptors for neurotransmitters // *Neurosci. Lett.* 1983, suppl. Vol. 11. S4—S5.
- Johnston G. A. R., Curtis D. R., Davies J., McCulloch R. M.** Spinal interneurone excitation by conformationally restricted analogues of L-glutamic acid // *Nature.* 1974. Vol. 248, N 5451. P. 804—805.
- Johnston G. A. R., Kennedy S. M. J., Twitchin B.** Action of the neurotoxin kainic acid on high affinity uptake of L-glutamate in rat brain slices // *J. Neurochem.* 1979. Vol. 32, N 1. P. 121—127.
- Kanner B. I.** Active transport of γ -aminobutyric acid by membrane vesicles isolated from rat brain // *Biochemistry.* 1978. Vol. 17, N 7. P. 1207—1211.
- Karpiak S. E., Mahadik S. P., Graf L., Rapport M. M.** An immunological model of epilepsy: seizures induced by antibodies to G_{m1} ganglioside // *Epilepsia.* 1981. Vol. 22, N 2. P. 189—196.
- Karpiak S. E., Serokisz M., Rapport M. M.**

- Effect antisera to S-100 protein and to synaptic membrane fraction on maze performance and EEG // *Brain Res.* 1976. Vol. 102, N 3. P. 313—321.
- Kawai N., Niwa A., Abe T.** Spider venom contains specific blocker of glutamatergic synapses // *Brain Res.* 1982. Vol. 247, N 1. P. 169—171.
- Kehoe J. S.** Transformation by concanavalin A of the response of molluscan neurones to L-glutamate // *Nature.* 1978. Vol. 274, N 5674. P. 345—346.
- (Kelle J. B.) Келле Дж. Б.** Анатомические, биохимические и фармакологические аспекты холинергической передачи // *Сравнительная фармакология синаптических рецепторов.* Л., 1977. С. 6—15.
- Kendrew J. C.** Myoglobin and the structure of proteins // *Science.* 1963. Vol. 139, N 3561. P. 1259—1266.
- Kistler J., Stroun R. M., Klymkowsky M. W., Lalancette R. A., Fairclough R. H.** Structure and function of an acetylcholine receptor // *Biophys. J.* 1982. Vol. 37, N 1. P. 371—383.
- Köller K. L., Coyle J. T.** Characterization of the interactions of N-acetyl-aspartyl-glutamate with ^3H -L-glutamate receptors // *Eur. J. Pharmacol.* 1984. Vol. 98, N 2. P. 193—199.
- Koller K. J., Coyle J. T.** The characterization of the specific binding of ^3H -N-acetyl-aspartylglutamate to rat brain membranes // *J. Neurosci.* 1985. Vol. 5, N 11. P. 2882—2888.
- Köhler G., Milstein C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature.* 1975. Vol. 256. P. 495—497.
- Köhler G.** The technique of hybridoma production // *Immunol. Meth.* 1981. Vol. 11. P. 285—308.
- Köhler G., Schwarcz R.** Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in rat brain: a histological study // *Neurosci.* 1983. Vol. 8, N 4. P. 819—834.
- Koshia K.** Solubilization of quisqualate sensitive L- ^3H -glutamate binding sites from guinea pig brain membranes using a zwitterionic detergent // *Life Sci.* 1985. Vol. 37, N 15. P. 1373—1379.
- Koshland D. E., Russo A. F., Gutterson N. I.** Information processing in a sensory system // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1983. Vol. 48. P. 805—810.
- Krnjević K., Phillis J. K.** Ionophoretic studies of neurons in the mammalian cerebral cortex // *J. Physiol.* 1963. Vol. 165, N 2. P. 274—304.
- Lanoffo L., Hainemann U.** Aspartate and glutamate induced reductions in extracellular free calcium and sodium concentration in area CA1 of «in vitro» hippocampal slices of rats // *Neurosci. Lett.* 1983. Vol. 35, N 1. P. 79—84.
- Ländesmäki P., Airaksinen K., Vartiainen M., Halonen P.** Characterization of two synaptosomal peptides in calf brain // *Acta Chemica Scand.* 1980. Vol. 34, N 5. P. 343—348.
- Lim R., Cheung S. T., Crayton J. W.** L-Aspartyl-L-alanine (a neural dipeptide) enhances synaptic transmission // *Experientia.* 1981. Vol. 37, N 2. P. 158—160.
- Luini A., Goldberg O., Teichberg V. I.** Distinct pharmacological properties of excitatory amino acid receptors in the rat striatum: study by Na^+ efflux assay // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1981. Vol. 78, N 5. P. 3250—3254.
- Luini A., Goldberg O., Teichberg V. I.** Differential sensitivity of selected brain areas to excitatory amino acids // *Neurosci. Lett.* 1983. Vol. 41, N 3. P. 307—312.
- Luini A., Tal N., Goldberg O., Teichberg V. I.** An evaluation of selected brain constituents as putative excitatory neurotransmitters // *Brain Res.* 1984. Vol. 324, N 2. P. 271—279.
- Lunt G. G.** Hydrophobic proteins from locust (*Schistocerca gregaria*) muscle with glutamate binding properties // *Comp. Gen. Pharmac.* 1973. Vol. 4, N 1. P. 75—80.
- Lunch G., Baudry M.** The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis // *Science.* 1984. Vol. 224, N 4653. P. 1057—1063.
- Madden S. C., Woods R. R., Shull J. H., Remington M. D., Whipple G. H.** Tolerance to amino acid mixtures and casein digests given intravenously: glutamic acid responsible for reactions // *J. Exp. Med.* 1945. Vol. 81, P. 439—447.
- Malouf A. T., Schnaar P. L., Coyle J. T.** Characterization of a glutamatic acid neurotransmitter binding site on neuroblastoma hybrid cells // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259, N 20. P. 12756—12762.
- Mangano R. M., Schwarcz R.** The human platelet as a model for the glutamatergic neuron: platelet uptake of L-glutamate // *J. Neurochem.* 1981. Vol. 36, N 3. P. 1067—1076.
- Maruhashi J.** Three types of chemical modification — effects induced by va-

- rious chemical reagents on the glutamate receptors in molluscan neurons // *Japan. J. Physiol.* 1984. Vol. 34, N 6. P. 1049—1064.
- Maziere M., Prenant C., Sastre J., Crouzel M., Comar D.** ^{11}C -Ro 15-1788 et ^{11}C -flunitrazepam, deux coordonnés pour l'étude par tomographie par positrons des sites de liaison des benzodiazépines // *C. R. Seances Acad. Sci., Ser. 3.* 1986. Vol. 296, N 18. P. 871—876.
- McCreely M. J., Carpenter D. O.** Modulation of neuronal responses to L-glutamate in *Aplysia* // *Cell Mol. Neurobiol.* 1984. Vol. 4, N 1. P. 91—95.
- McLennan H.** Receptors for the excitatory amino acids in the mammalian central nervous system // *Progr. Neurobiol.* 1983. Vol. 20, N 3—4. P. 251—271.
- Meldrum B.** Epilepsy // *The Molecular Basis of Neuropathology* / A. N. Davison, R. H. S. Thompson. London, 1981. P. 183—238.
- (**Meldrum B.**) **Мелдрум Б.** Нейромедиаторы и эпилепсия // *Нейротрансмиттерные системы.* М., 1982. С. 164—179.
- Meldrum B. S.** Amino acid neurotransmitters and new approaches to anticonvulsant drug action // *Epilepsia.* 1984. Vol. 25, Suppl 2. P. S140—S149.
- Menna E. E., Fagg G. E., Cotman C. W.** Chloride ions enhance L-glutamate binding to rat brain synaptic membranes // *Brain Res.* 1982. Vol. 243, N 2. P. 378—381.
- The metabolism of the human brain studies with positron emission tomography** / Eds. T. Greitz, D. H. Ingvar, L. Widén. New York, 1985. 536 p.
- Meister A.** Biochemistry of glutamate: Glutamine and glutathion // *Glutamic acid: Adv. Biochem. Physiol.* / Eds. L. J. Filer et al. New York, 1979. P. 69—84.
- Metter E. J., Piege W. H., Hanson W. R., Phelps M., Kuhl D. E.** Evidence for caudate role in aphasia from FDG positron emission tomography // *Производство радионуклидов и их использование в медицине.* М., 1986. Т. 1. 13 с.
- Michaelis E. K.** Partial purification and characterization of a glutamate-binding membrane glycoprotein from rat brain // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1975. Vol. 65, N 3. P. 1004—1012.
- Michaelis E. K.** The glutamate receptor-like protein of brain synaptic membranes is a metalloprotein // *Biochem. Biophys. Res. Com.* 1979. Vol. 87, N 1. P. 106—113.
- Michaelis E. K., Calton N., Earlys L.** Spider venoms inhibit L-glutamate binding to brain synaptic membrane receptors // *Proc. Nat. Acad. USA.* 1984a. Vol. 81, N 17. P. 5571—5574.
- Michaelis E. K., Chittenden W. L., Johnson B. E., Galton N., Decedue C.** Purification, biochemical characterization, binding activity and selectivity of a glutamate binding protein from bovine brain // *J. Neurochem.* 1984b. Vol. 42, N 2. P. 397—406.
- Michaelis E. K., Michaelis M. L., Boyarsky L. L.** High-affinity glutamic acid binding to brain synaptic membranes // *Biophys. Biochem. Acta.* 1974. Vol. 367, N 3. P. 338—348.
- Michaelis E. K., Michaelis M. L., Chang H. H., Belien R. M., Grubbs R. D.** Biochemical-molecular characteristics of the brain synaptic membrane glutamate receptor // *Amino Acid Neurotransmitters* / Eds. F. V. De Feudis, P. Mandel. New York, 1981a. P. 387—395.
- Michaelis E. K., Michaelis M. L., Chang H. H., Grubbs R. D., Kuonen D. R.** Molecular characteristics of glutamate receptors in mammalian brain // *Mol. Cell. Biochem.* 1981b. Vol. 38, N 3. P. 163—179.
- Michaelis E. K., Michaelis M. L., Stromann T. M., Chittenden W. L., Grubbs R. D.** Purification and molecular characterization of the brain synaptic membrane glutamate-binding protein // *J. Neurochem.* 1983. Vol. 40, N 6. P. 1742—1753.
- (**Mihailovic L., Cupic D.**) **Михайлович Л., Чупич Д.** Иммуногенные эпилептические припадки // *Моделирование заболеваний.* М., 1973. С. 82—91.
- Moolenaar W. H., Boonstra J., Van der Saag R., De Laat S. W.** Sodium-proton exchange in mouse neuroblastoma cells // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256, N 24. P. 12883—12887.
- Moolenaar W. H., Spector J.** Ionic currents in cultured mouse neuroblastoma cells under voltage-clamp conditions // *J. Physiol.*, 1979. Vol. 278. P. 265—286.
- Nadler J. V., Perry B. W., Cotman C. W.** Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells // *Nature.* 1978b. Vol. 271, N 5646. P. 676—677.
- Nadler J. V., White W. F., Vaca K. W.,**

Perry B. W. V. mical corre
diated by g
J. Neuroch
P. 147—153
Nelson P. G.
in culture
Vol. 55, N
Neuroreceptor
1982. 367 S
Newsomdavis
Acetylcholin
nical and
Symp. on R
Disease. 198
Nirenberg M.
and metho
Meth. Enzym
794.
Nistri A., Con
cal character
of GABA an
vertebrates a
Neurobiol. 19
235.
Nonamed K. M.
Constanti A.
sion of functi
glutamate rec
tes injected y
Nature. 198
P. 318—320.
Nowak L., Breg
Herbet A., Pr
gates glutama
mouse centr
1984. Vol. 307
Ogita K., Yonec
the Ca^{2+} -stir
the Cl^- -depen
tamate in syn
rat brain //
Vol. 4, N 2. P
Ogita K., Kitago
kuda Y., Koio
neda Y. Glut
tion of Na^+ -in
pendent bindin
in rat brain //
N 25. P. 2411—
Olney J. W. Bra
other disturban
monosodium g
1989. Vol. 16
721.
Olney J. W. Glu
nal necrosis in
thalamus // J. M
rol. 1971. Vol.
Olney J. W. Kaini
totoxins: a cor

- Perry B. W., Cotman C. W.** Biochemical correlates of transmission mediated by glutamate and aspartate // *J. Neurochem.* 1978. Vol. 31, N 1. P. 147—155.
- Nelson P. G.** Nerve and muscle cells in culture // *Physiol. Rev.* 1975. Vol. 55, N 1. P. 1—44.
- Neuroreceptors** / Ed. Hucho F. Berlin, 1982. 367 S.
- Newsomdavis J., Vincent A., Willcox N.** Acetylcholine receptor antibody: clinical and experimental aspects // *Symp. on Receptors, Antibodies and Disease.* 1982. Vol. 90. P. 225—246.
- Nirenberg M.** Cultured cell systems and methods for neurobiology // *Meth. Enzymol.* 1974. Vol. 32. P. 765—794.
- Nistri A., Constanti A.** Pharmacological characterization of different types of GABA and glutamate receptors in vertebrates and invertebrates // *Prog. Neurobiol.* 1979. Vol. 13, N 12. P. 117—235.
- Nonamed K. M., Bilbe G., Smart T. G., Constanti A., Braun D. A.** Expression of functional GABA, glycine and glutamate receptors in *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA // *Nature.* 1984. Vol. 310, N 5975. P. 318—320.
- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbert A., Prochiantz A.** Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central nervous // *Nature.* 1984. Vol. 307, N 5950. P. 462—465.
- Ogita K., Yoneda Y.** Differentiation of the Ca^{2+} -stimulated binding from the Cl^- -dependent binding of ^3H -glutamate in synaptic membranes from rat brain // *Neurosci. Res.* 1986. Vol. 4, N 2. P. 129—142.
- Ogita K., Kitago T., Nakamuta H., Fukuda Y., Koida M., Ogawa Y., Yoneda Y.** Glutathione-induced inhibition of Na^+ -independent and Na^+ -dependent binding of L-(^3H)-glutamate in rat brain // *Life Sci.* 1986. Vol. 39, N 25. P. 2411—2418.
- Olney J. W.** Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate // *Science.* 1969. Vol. 164, N 3880. P. 719—721.
- Olney J. W.** Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant moose hypothalamus // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1971. Vol. 30, N 1. P. 75—90.
- Olney J. W.** Kainic acid and other excitotoxins: a comparative analysis // *Glutamate as a neurotransmitter* / Eds. G. Di Chiara, G. L. Gessa. New York, 1981. P. 375—384.
- Olney J. W., Price M. T.** Neuroendocrine effects of excitotoxic amino acids // *Glutamate as a Neurotransmitter* / Eds. G. D. Di Chiara, G. L. Gessa. New York, 1981. P. 423—432.
- Olney J. W., Sharpe L. G., Feigin R. D.** Glutamate-induced brain damage in infant primates // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1972. Vol. 31, N 3. P. 464—488.
- Oomura J., Ooyama H., Sawada M.** Analysis of hyperpolarizations induced by glutamate and acetylcholine on *Onchidium* neurons // *J. Physiol.* 1974. Vol. 243. P. 321—341.
- Orrego F.** Criteria for the identification of central neurotransmitter and their application to studies with some nerve tissue preparation in vitro // *Neurosci.* 1979. Vol. 4, N 8. P. 1037—1057.
- Pafferty M. A., Hunkapiller M. W., Strader C. D., Hood L. E.** Acetylcholine receptor: Complex of homologous subunits // *Science.* 1980. Vol. 208, N 4451. P. 1454—1456.
- Rin J.-P., Bockaert J., Recasens M.** The Ca^{2+} / Cl^- -dependent L- ^3H glutamate binding: A new receptor or a particular transport process? // *FEBS Lett.* 1984. Vol. 175, N 1. P. 31—36.
- Perry T. L., Hansen S.** Amino acid abnormalities in epileptogenic foci // *Neurology.* 1981. Vol. 31. P. 872—876.
- Prasad K. N., Nayak M., Edwards-Prasad J. E., Cummings S., Pattisapu K.** Modification of glutamate effects on neuroblastoma cells in culture by heavy metals // *Life Sci.* 1981. Vol. 27, N 23. P. 2251—2259.
- Quik M.** Presence of an endogenous factor which inhibits binding of α -bungarotoxin 2, 2 to its receptor // *Brain Res.* 1982. Vol. 245, N 1. P. 57—65.
- Rainbow T. C., Bleisch W. V., Biegon A., McEwen B. S.** Quantitative densitometry of neurotransmitter receptors // *J. Neurosci. Meth.* 1982. Vol. 5, N 2. P. 127—135.
- Rin J.-P., Bockaert J., Recasens M.** The binding of acidic amino acids to snail, *Helix aspersa*, perisiphagic ring membranes reveals a single high affinity glutamate (kainate sites) // *Brain Res.* 1986. Vol. 336, N 1/2. P. 290—299.
- Riveros N., Orrego F. A.** A study of possible excitatory effects of N-acetylaspartylglutamate in different in vivo

- and in vitro brain preparations // *Brain Res.* 1984. Vol. 299, N 2. P. 393—395.
- Roberts C. J., Walker R. J.** The actions of L-glutamate and putative glutamate agonists on the central neurons of *Limulus polyphemus* // *Com. Biochem. Physiol.* 1982. Vol. 73, N 1. P. 167—175.
- Roberts P. J.** Glutamate receptors in the rat central nervous system // *Nature.* 1974. Vol. 252, N 5482. P. 399—401.
- Robinson N. L.** A glutamate-sensitive adenylcyclase from insect muscle // *Neurosci. Lett.* 1980. Suppl. 5. P. 80.
- Roy S., Michaelis E. K.** Antibodies against the bovine brain glutamate binding protein // *J. Neurochem.* 1984. Vol. 42, N 3. P. 838—841.
- Saito M., Kawai N., Miwa A., Pan-Uon H., Yoshioka M.** Spider toxin (JSTX) blocks glutamate synapse in hippocampal pyramidal cells // *Brain Res.* 1985a. Vol. 346, N 2. P. 397—399.
- Saito M., Kawai N., Miwa A., Yamagushi S.** Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of the squid giant synapse // *Neurosci. Res.* 1985b. Vol. 2, N 5. P. 297—307.
- Samuels S., Fish I., Schwartz S. A.** Anticonvulsant activity of glycylglycine and γ -aminovaleic acids: evidence for glutamin exchange in amino acid transport // *J. Neurochem.* 1983. Vol. 40, N 4. P. 1063—1069.
- Sanderson C., Murphy S.** Development of binding sites for glutamate in rat cortex // *Multidisciplin: Approach Brain Develop.* Amsterdam, 1980. P. 233—234. (Proc. Int. Meet.).
- Sanderson C., Murphy S., Uzbekov M. G.** The appearance of serotonin and glutamate neurotransmitter receptors during brain development // *Ontog. Brain. Praha*, 1982. Vol. 3. P. 197—204.
- Scatchard G.** The attractions of proteins for small molecules and ions // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1949. Vol. 51, N 4. P. 660—672.
- Sershen H., Reith M. E. A., Hashim A., Lajtha A.** Endogenous material in brain inhibiting ^3H -nicotine and ^3H -acetylcholine binding // *J. Neurosci. Res.* 1984. Vol. 12, N 4. P. 563—569.
- Shank R. P., Aprison M. H.** Biochemical aspects of the neurotransmitter function of glutamate // *Glutamic Acid: Adv. Biochem. and Physiol.* / Eds. L. J. Filer, Jr. et al. New York, 1979. P. 139—150.
- Sharif N. A., Roberts P. J.** Effect of guanine nucleotides on binding of ^3H -glutamate to cerebellar synaptic membranes // *Europ. J. Pharmacol.*, 1980a. Vol. 61, N 2. P. 213—214.
- Sharif N. A., Roberts P. J.** Problems associated with the binding of L-glutamic acid to synaptic membranes: methodological aspects // *J. Neurochem.* 1980b. Vol. 34, N 4. P. 779—784.
- Sharif N. A., Roberts P. J.** Regulation of cerebellar L- ^3H -glutamate binding. Influence of guanine nucleotides and Na^+ -ions // *Biochem. Pharmacol.* 1981. Vol. 30, N 21. P. 3019—3022.
- Shimizu H., Ishishita H., Odagiri H.** Stimulated formation of cyclic adenosine 3,5-monophosphate by aspartate and glutamate in cerebral cortical slices of guinea pig // *J. Biol. Chem.* 1974. Vol. 249, N 18. P. 5955—5962.
- Shimizu H., Ishishita H., Tateishi M., Umeda I.** Characteristics of the amino acid receptor site mediating formation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mammals brains // *Mol. Pharmacol.* 1975. Vol. 11, N 2. P. 223—231.
- Sieghart W.** Glutamate-stimulated phosphorylation of a specific protein in P_2 fractions of rat cerebral cortex // *J. Neurochem.* 1981. Vol. 37, N 5. P. 1116—1124.
- Simon R. P., Swan J. H., Griffiths T., Meldrum B. S.** Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain // *Science.* 1984. Vol. 226, N 4676. P. 850—852.
- Slevin J., Collins J. F., Lindsley K., Coyle J. T.** Specific binding of ^3H -glutamate to cerebellar membranes: Evidence for recognition site heterogeneity // *Brain Res.* 1982. Vol. 249, N 2. P. 353—360.
- Snyder S. H.** Molecular aspects of neurotransmitter receptors: An overview // *Handbook of Psychopharmacology.* 1983. Vol. 17. P. 1—12.
- Smith D. A., Burton N.** Excitatory amino acid receptor nomenclature // *Trends in Neurosci.* 1986. Vol. 9, N 8. P. 315.
- Stegink L. D., Filer L. J., Baker G. L., Muller S. M., Wu-Ridevut M. J.-C.** Factors affecting plasma glutamate levels in normal adult subjects // *Glutamic Acid: Adv. Biochem. Physiol.*

- siol. Eds. L. J. Filer, Jr. et al. New York, 1979. P. 333—352.
- Stegink L. D., Reynolds W. A.** Comparative metabolism of glutamate in the mouse, monkey and man // *Glutamic Acid: Adv. Biochem. Physiol.* / Eds. L. J. Filer, Jr. et al. New York, 1979. P. 85—102.
- Streit P.** Glutamate and aspartate as transmitter candidates for systems of the cerebral cortex // *Glutamate as a transmitter* / Eds. Roberts P. J. et al. New York, 1980. P. 119—143.
- Stroud R. M., Moore J. F.** Acetylcholine receptor structure, function and evolution // *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1985. Vol. 1. P. 317—352.
- Tal N., Goldberg O., Luini A., Teichberg V. I.** An evaluation of γ -glutamyl dipeptide derivatives as antagonists of amino acid-induced Na^+ -fluxes in rat striatum slices // *J. Neurochem.* 1982. Vol. 39, N 2. P. 544—576.
- Teichberg V. I., Goldberg O., Luini A.** The stimulation of ion fluxes in brain slices by glutamate and other excitatory amino acids // *Mol. Cell. Biochem.* 1981. Vol. 39. P. 281—296.
- Teichberg V. I., Tal N., Goldberg O., Luini A.** Barbiturates, alcohols and the CNS excitatory neurotransmission: Specific effects on the kainate and quisqualate receptors // *Brain Res.* 1984. Vol. 291, N 4. P. 285—292.
- Theodore W. H.** Recent advances in the diagnosis and treatment of seizure disorders // *Trends. Neurosci.* 1985. Vol. 8. P. 144—147.
- Theodore W. H., Books P., Margolis R., Patronas N., Sato S., Porter R. J., Mansi L., Bairamian D., Di Chiro G.** Positron emission tomography in generalized seizures // *Neurology.* 1985. N 5. P. 684—690.
- Thompson J.M., London E. D., Johnston J. E.** Ultrastructural, functional and biochemical characteristics of mouse and human neuroblastoma cell lines // *Neurosci.* 1982. Vol. 7, N 7. P. 1807—1816.
- Toffano G., Guidotti A., Costa E.** Purification of an endogenous protein inhibitor of the high affinity binding of γ -aminobutyric acid to synaptic membranes of rat brain // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1978. Vol. 75, N 8. P. 4024—4028.
- Tsuchiga T., Misawa A., Miyake Y., Yamasaki K., Niiya S.** Solubilization and reconstitution of membrane energy-transducing systems of *Escherichia coli* // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 142, N 2. P. 231—234.
- Turski L., Cavalherio E. A., Turski W. A., Meldrum B. S.** Excitatory neurotransmission within substantia nigra pars reticulata regulated by threshold for seizures produced by pilocarpine in Rats: effect of intranigral 2-amino-7-phosphonohepatonoate and D-methyl-D-aspartate // *Neurosci.* 1986. Vol. 18, N 1. P. 61—78.
- Tzartos S. J., Rand D. E., Einarson B. L., Lindstrom J. M.** Mapping of surface structures of electrophorus acetylcholine receptor using monoclonal antibodies // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256, N 16. P. 8635—8645.
- Tzardos S. J., Seybold M. E., Lindstrom J. M.** Specificities of antibodies to acetylcholine receptors in serum from myasthenia gravis patients by monoclonal antibodies // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1982. Vol. 79, N 1. P. 188—192.
- Usherwood P. N. R.** Neuromuscular transmission in insects // *Identified Neurones and Behaviour of Arthropods.* New York, 1977. P. 31—48.
- Usherwood P. N. R.** Amino acids as neurotransmitters // *Adv. Comp. Physiol. Biochem.* 1978. Vol. 7, N 2. P. 227—309.
- Usherwood P. N. R., Duce I. R., Boden Ph.** Slowly reversible block of glutamate receptor channels by venoms of the spiders, *argiope trifasciata* and *Araneus gemma* // *J. Physiol. Paris.* 1984. Vol. 79, N 4. P. 241—245.
- Vargas F., Costa E.** Regulation of hippocampal glutamate receptor: role of a calcium-dependent cysteine proteinase // *Glutamate as a Neurotransmitter.* / Eds. G. DiChiara, G. L. Gessa. New York, 1981. P. 307—316.
- Venter J. C.** Monoclonal antibody and autoantibodies in the isolation and characterization of neurotransmitter receptors: the future of receptor research // *J. Molec. Cell. Cardiology.* 1982. Vol. 14, N 12. P. 687—694.
- Venter J. C., Fraser C.** The structure and evolution of neurotransmitter receptors: α - and β -adrenergic, dopaminergic and muscarine cholinergic // *Neurotransmit. Receptors Mech. Act.* New York, 1984. P. 271—288.
- Vincent A.** Immunology of acetylcholine receptors in relation to miasthenia gravis // *Physiol. Rev.*, 1980. Vol. 60, N 3. P. 756—824.

Vincent St. R., McGeer E. G. A comparison of sodium-dependent glutamate binding with high-affinity glutamate uptake in rat striatum // *Brain Res.* 1980. Vol. 184, N 1. P. 99—108.

Vyklicky L., Krüsek J., Vyklicky Z., Vyscočil F. Spider venom of araneus opens and desensitizes glutamate channels in chick spinal cord neurones // *Neurosci. Lett.* 1986. Vol. 68, N 2. P. 227—231.

Walker R. J., James V. A., Roberts C. J., Kerkut G. A. Studies on amino acid receptors of *Hirudo*, *Limulus* and *Periplaneta* // *Neurotransmitt. Invertebr.: Symp. 28th Int. Congr. Physiol. Sci. Budapest*, 1981. P. 161—168.

Wagner H. N., Burns H. D., Donnals R. F. et al. Imaging dopamine receptors in the human brain by positron tomography // *Science*. 1983. Vol. 221, N 4236. P. 1264—1266.

Watkins J. C., Evans R. H. Excitatory amino acid Transmitters // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1981. Vol. 21, N 2. P. 165—204.

Watters D., Maelicke A. Organization of ligand-binding sites at the acetylcholine receptor: a study with monoclonal antibodies // *Biochemistry*. 1983. Vol. 22, N 8. P. 1811—1819.

Waugh D. F. Protein-protein interactions // *Adv. Prot. Chem.* 1954. Vol. 9, N 4. P. 325—437.

Werling L. L., Doman A., Nadler J. V.

Complex binding of L-³H-glutamate to hippocampal synaptic membranes in the absence of sodium // *J. Neurochem.* 1983. Vol. 41, N 2. P. 586—593.

Werling L. L., Nadler J. V. Complex binding of L-³H-glutamate to hippocampal synaptic membranes in the absence of sodium // *J. Neurochem.* 1982. Vol. 38, N 4. P. 1050—1062.

Wheal H. V., Miller J. J. Pharmacological identification of acetylcholine and glutamate excitatory system in the dentate gyrus of the rat // *Brain Res.* 1980. Vol. 182, N 1. P. 145—155.

Whittemore S. R., Mena E. E., Monaghan D. T., Cotman C. W. Regional distribution and ionic requirement of Cl⁻/Ca²⁺-activated and Cl⁻/Ca²⁺-independent glutamate receptors in rat brain // *Brain Res.* 1983. Vol. 277, N 3. P. 99—107.

Yoshioka M., Hou H., Kawai N. A glutamate receptor inhibitor // *Eur. Pat. Appl.* 1984. P. 156, 540.

Zaczek R., Koller K., Cotter R., Heller D., Coyle J. T. N-acetylaspartylglutamate: an endogenous peptides with affinity for a brain «glutamate» receptor // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1983. Vol. 80, N 4. P. 1116—1119.

Zieglgänsberger W., Puil E. A. Tetrodotoxin interference of CNS excitation by glutamic acid // *Nature*. 1972. Vol. 239, N 94. P. 204—205.

Дополнительная литература

Asher P., Henderson J., Johnson M. Interaction of glycine with NMDA-receptor // *Neurochem. Internat.* 1988. Vol. 13. P. 27.

Honoré T., Nielsen E., Drejer J. Excitatory amino acid receptor subtype and specific antagonists // *Neurochem. Intern.* 1988. Vol. 13, suppl. 1. P. 18.

Kushner L., Lerma J., Zukin R., Bennett M. Coexpression of NMDA- and phencyclidine-receptors in *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1988. Vol. 85. P. 3250—3254.

Saito M., Ohsako S., Deguchi T., Ka-

wai N. Glutamate receptors expressed in *Xenopus* oocytes by messenger RNA from invertebrate muscle // *Mol. Brain. Res.* 1987. Vol. 3. P. 83—87.

Schofield P., Darlison M. G., Fujita N., Burt D. et al. Sequence and functional expression of the GABA receptor shows a ligandgated receptor superfamily // *Nature*. 1987. Vol. 328. P. 221—227.

Snutch T. P. The use of *Xenopus* oocytes to probe synaptic communication // *Trends Neurosci.* 1988. Vol. 11, N 6. P. 250—256.

Предис
Введение
Глава 1.

1.1. Метабо
1.2. Роль г
нервно
1.3. Вовлеч
лепсии
1.4. Некото
Глава 2.

2.1. Глутам
ция гл
2.2. Рецепто
влияни
2.3. Взаимо
мембра
2.4. Класси
Глава 3.

3.1. Глутам
тов син
3.2. Химичес
мембран
3.3. Сравнит
ших мем
3.4. Иммуно
мозгу).
Глава 4.

4.1. Примене
рецептор
4.2. Изучени
в гибрид
4.3. Исследо
управляе
4.4. Регуляц
Заключе
Литерату

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Введение	5
Глава 1. Глутаматные рецепторы. Физиологическое значение в нервной ткани	8
1.1. Метаболизм глутамата в центральных синапсах	8
1.2. Роль глутамата и глутаматсодержащих пептидов в организации высшей нервной деятельности	13
1.3. Вовлечение глутаматергических систем в механизмы патогенеза эпилепсии	19
1.4. Некоторые аспекты эволюции рецепторов глутамата	28
Глава 2. Распределение и свойства глутаматсвязывающих участков синаптических мембран головного мозга	35
2.1. Глутаматергические пути головного мозга млекопитающих и локализация глутаматных рецепторов в нейронах	35
2.2. Рецепторное связывание L- ³ H-глутамата с мембранами нервных клеток: влияние катионов Na ⁺ и Ca ²⁺	43
2.3. Взаимодействие структурных аналогов глутамата с синаптическими мембранами	52
2.4. Классификация глутаматных рецепторов	63
Глава 3. Физико-химические и иммунохимические характеристики глутаматсвязывающих мембранных белков головного мозга	70
3.1. Глутаматсвязывающая активность выделенных и очищенных препаратов синаптических мембранных белков	70
3.2. Химический состав и кДНК, кодирующая синтез глутаматсвязывающих мембранных белков	81
3.3. Сравнительный анализ физико-химических свойств глутаматсвязывающих мембранных белков мозга крыс и человека	89
3.4. Иммунохимическая идентификация глутаматных рецепторов в головном мозгу).	94
Глава 4. Регуляция ионселективной и транспортной функции глутаматных рецепторов в мембранных везикулах, протеолипосомах и интактных нейронах	104
4.1. Применение липосом и мембранных везикул для изучения функции рецепторных белков	104
4.2. Изучение особенностей функционирования глутаматных рецепторов в гибридных клетках нейробластомы	110
4.3. Исследование механизмов активации и блокирования ионных каналов, управляемых L-глутаматом	114
4.4. Регуляция функции глутаматных рецепторов головного мозга	118
Заключение	125
Литература	129

302
2р. 20к.

С.А. Дамбинова
**Нейро-
рецепторы
ГЛУТАМАТА**



„НАУКА”
Ленинградское
отделение